Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Maestría

Caracterización fisicoquímica de películas comestibles elaboradas con almidón de mandioca nativo o modificado e hidroxipropil metilcelulosa (HPMC) y actividad antimicrobiana de agentes preservadores retenidos en ellas

Alzate Calderón, Paola Carolina

2017

Este documento forma parte de las colecciones digitales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en bibliotecadigital.exactas.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the digital collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in bibliotecadigital.exactas.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Alzate Calderón, Paola Carolina. (2017). Caracterización fisicoquímica de películas comestibles elaboradas con almidón de mandioca nativo o modificado e hidroxipropil metilcelulosa (HPMC) y actividad antimicrobiana de agentes preservadores retenidos en ellas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6429_AlzateCalderon

Cita tipo Chicago:
Alzate Calderón, Paola Carolina. "Caracterización fisicoquímica de películas comestibles elaboradas con almidón de mandioca nativo o modificado e hidroxipropil metilcelulosa (HPMC) y actividad antimicrobiana de agentes preservadores retenidos en ellas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017. https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6429_AlzateCalderon

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. **Contacto:** bibliotecadigital.exactas.uba.ar
Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Maestría en Bromatología y Tecnología de la Industrialización de Alimentos

Caracterización fisicoquímica de películas comestibles elaboradas con almidón de mandioca nativo o modificado e hidroxipropil metilcelulosa (HPMC) y actividad antimicrobiana de agentes preservadores retenidos en ellas

Tesis presentada para optar al título de Magíster de la Universidad de Buenos Aires en Bromatología y Tecnología de la Industrialización de Alimentos

Autor: Microbióloga Industrial. Paola Carolina Alzate Calderón

Directora de tesis: Dra. Lía Noemí Gerschenson

Co-Directora de tesis: Dra. Silvia Flores

Departamento de Industrias

Buenos Aires, 2017

Caracterización fisicoquímica de películas comestibles elaboradas con almidón de mandioca nativo o modificado e hidroxipropil metilcelulosa (HPMC) y actividad antimicrobiana de agentes preservadores retenidos en ellas

RESUMEN

Se desarrollaron películas comestibles antimicrobianas a partir de almidón nativo o modificado de mandioca e hidroxipropil metilcelulosa (HPMC), plastificadas con glicerol y adicionadas con los preservadores sorbato de potasio (KS) y carvacrol (Carv). Para la caracterización de las películas, elaboradas por la técnica de casteo, se realizaron ensayos mecánicos (tracción), se determinaron el color, la solubilidad en agua, la permeabilidad al vapor de agua; se llevaron a cabo estudios de microscopía electrónica, estudios de estabilidad termoquímica y reología (DMA) y, se analizaron los espectros FTIR. Para la evaluación de la actividad antimicrobiana, se realizó el ensayo de difusión de los antimicrobianos a un medio semi-sólido inoculado y se determinó la capacidad de las películas para actuar como barrera a la contaminación externa. En ambos casos se emplearon como microorganismos de prueba *Zygosaccharomyces bailii, Lactobacillus plantarum y Pseudomonas fluorescens*. De manera general, los resultados mostraron que las películas elaboradas con almidón acetilado fueron más opacas, más resistentes a la tracción y con una tendencia a una mayor solubilidad. Los análisis microestructurales y de DMA mostraron que las películas constituyeron matrices mezcla de biopolímeros con presencia de fases separadas. A su vez, se pudo demostrar la capacidad antimicrobiana de los preservadores frente a los microorganismos testeados con ambos tipos de películas, resaltando que las películas elaboradas con almidón nativo mostraron una mayor eficiencia en la acción inhibitoria frente a las bacterias y a la levadura evaluadas.

PALABRAS CLAVE

Películas comestibles, almidón, sorbato de potasio, carvacrol, actividad antimicrobiana, caracterización mecánica.

Physicochemical characterization of edible films based on native or modified cassava starch and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) and antimicrobial activity of preservative agents retained therein

ABSTRACT

Antimicrobial edible films were prepared from native or modified cassava starch and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), plasticized with glycerol and added with preservatives potassium sorbate (KS) and carvacrol (Carv). Films were elaborated by casting technique and for their characterization, mechanical tests were carried out (tensile), color, solubility in water, water vapor permeability were determined; electron microscopy, thermochemical stability and rheology (DMA) studies were performed and the FTIR spectra were analyzed. For the evaluation of antimicrobial activity, the antimicrobial diffusion assay was performed on an inoculated semi-solid medium and the ability of the films to act as a barrier to external contamination was determined. In both cases *Zygosaccharomyces bailii, Lactobacillus plantarum and Pseudomonas fluorescens* were used as target microorganisms. In general, the results showed that the films made with acetylated starch were opaquer, more resistant to traction and with a tendency to a higher solubility. Microstructural and DMA analyzes showed that the films constituted mixed matrices of biopolymers with presence of separate phases. In addition, it was possible to demonstrate the antimicrobial capacity of the preservatives against the microorganisms tested with both types of films, noting that the films made with native starch showed a greater efficiency in the inhibitory action against the evaluated bacteria and yeast.

KEY WORDS

Edible films, starch, potassium sorbate, carvacrol, antimicrobial activity, mechanical characterization.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer especialmente y en primer lugar a mi directora de tesis, la Doctora Lía Gerschenson quién me permitió formar parte de su equipo y desarrollar esta investigación.

A la Doctora Silvia Flores, mi co-directora por su ayuda incondicional, apoyo y todas las enseñanzas que me brindó durante estos años de trabajo.

A la Universidad de Buenos Aires, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de Argentina por financiar el presente trabajo de investigación.

Al Departamento de Industrias de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por facilitar el uso de sus instalaciones.

Al Ing. Javier Lecot del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA-UNLP) por su asesoramiento en la realización de los ensayos de DMA y DSC.

A la Dra. Carolina Ollé del Laboratorio de Microbiología Industrial (Departamento de Ingeniería Química – FI – UBA) por su colaboración en la obtención de las imágenes de microscopía óptica.

A mis compañeros del LOCAP por su compañerismo y por hacer del laboratorio un lindo lugar de trabajo.

A mi familia por apoyarme siempre.

Gracias.

DEDICATORIA

A mi ángel Valeriano que me guía cada día, paso a paso.

A mi hermosa mamá quien me impulsó para realizar este grandioso proyecto.

A Karim, el amor incondicional de mi vida por toda su comprensión y apoyo.

A mis hermanas: mis confidentes y amigas.

A toda mi familia que está siempre presente en cada etapa de mi vida.

A mi bebé Luca.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN ..... - 1 -

1.1. TENDENCIAS ACTUALES EN EMPAQUETAMIENTO DE ALIMENTOS ..... - 1 -
1.2. RECUBRIMIENTOS Y PELÍCULAS COMESTIBLES ..... - 2 -
1.3. MATERIALES USADOS EN LA ELABORACIÓN DE PELÍCULAS COMESTIBLES ..... - 3 -
1.3.1. Almidón ..... - 4 -
1.3.1.1. Propiedades del almidón: gelatinización – retrogradación ..... - 6 -
1.3.1.2. Modificación del almidón: acetilación ..... - 7 -
1.3.1.3. Almidón de mandioca ..... - 9 -
1.3.2. Celulosa ..... - 10 -
1.3.2.1. Hidroxipropil metilcelulosa ..... - 12 -
1.3.3. Mezclas de biopolímeros en la elaboración de películas ..... - 13 -
1.3.4. Plastificantes ..... - 14 -
1.4. ELABORACIÓN DE LAS PELÍCULAS ..... - 15 -
1.5. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS PELÍCULAS COMESTIBLES ..... - 16 -
1.5.1. Estructura física: estado amorfo y estado cristalino ..... - 16 -
1.5.2. Color ..... - 17 -
1.5.3. Comportamiento reológico ..... - 20 -
1.5.3.1. Ensayos cuasi-estáticos: tracción ..... - 20 -
1.5.3.2. Ensayos dinámicos ..... - 23 -
1.5.4. Propiedades térmicas (DSC) ..... - 26 -
1.5.5. Estructura química ..... - 26 -
1.5.6. Solubilidad ..... - 27 -
1.5.7. Permeabilidad al vapor de agua (PVA) ..... - 27 -
1.5.8. Hidrofilicidad / Hidrofobicidad ..... - 29 -
1.5.9. Características microestructurales ..... - 30 -
1.6. MICROORGANISMOS DETERIORATIVOS DE LOS ALIMENTOS ..... - 30 -
1.6.1. Bacterias ..... - 31 -
1.6.2. Levaduras ..... - 32 -
1.7. ADITIVOS CON ACCIÓN ANTIMICROBIANA USADOS EN PELÍCULAS COMESTIBLES ..... - 33 -
1.7.1. Carvacrol ..... - 34 -
1.7.2. Ácido sórbico y sorbato de potasio ..... - 36 -
1.8. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS PELÍCULAS ..... - 37 -
1.8.1. Ensayo de difusión en ágar ..... - 37 -
1.8.2. Ensayo de barrera ..... - 38 -

2. OBJETIVOS ..... - 40 -

2.1. OBJETIVO GENERAL ..... - 40 -
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... - 40 -

3. MATERIALES Y MÉTODOS ..... - 41 -

3.1. PROCESO DE MODIFICACIÓN DEL ALMIDÓN NATIVO (ACETILACIÓN) APLICANDO RADIACIONES DE MICROONDAS. ..... - 41 -
3.2. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE SUSTITUCIÓN DEL ALMIDÓN ACETILADO ..... - 42 -
3.3. CARACTERIZACIÓN DE ALMIDÓN NATIVO Y ACETILADO ..... - 43 -

3.3.1. Distribución del tamaño de partícula (dispersión estática de luz) ..... - 43 -
3.3.2. Microscopia electrónica de barrido ambiental (ESEM) ..... - 43 -
3.3.3. Espectroscopia infraroja con transformada de fourier (FTIR) ..... - 43 -
3.3.4. Difracción de rayos X ..... - 44 -
3.3.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) ..... - 44 -
3.3.6. Solubilidad y retención de agua ..... - 44 -
3.4. ELABORACIÓN DE LAS PELÍCULAS ..... - 45 -
3.4.1. Materiales ..... - 45 -
3.4.2. Películas conteniendo KS ..... - 45 -
3.4.3. Películas conteniendo KS y carvacrol ..... - 48 -
3.5. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA, MECÁNICA Y ESTRUCTURAL DE LAS PELÍCULAS COMESTIBLES. ..... - 49 -
3.5.1. Color ..... - 49 -
3.5.2. Espesor de las películas ..... - 50 -
3.5.3. Ensayo mecánico de tracción ..... - 50 -
3.5.4. Humedad ..... - 52 -
3.5.5. Solubilidad en agua ..... - 52 -
3.5.6. Permeabilidad al vapor de agua (PVA) ..... - 52 -
3.5.7. Análisis de la microestructura ..... - 54 -
3.5.7.1. Microscopía óptica ..... - 54 -
3.5.7.2. Microscopia electrónica de barrido ambiental (ESEM) ..... - 54 -
3.5.8. Ángulo de contacto ..... - 54 -
3.5.9. Espectroscopia FTIR ..... - 55 -
3.5.10. Análisis mecánico dinámico (DMA) ..... - 56 -
3.6. EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS PELÍCULAS COMESTIBLES .. - 56 -
3.6.1. Medios de cultivo y cepas ..... - 56 -
3.6.2. Preparación de los inóculos ..... - 57 -
3.6.3. Ensayo de difusión en ágar ..... - 57 -
3.6.4. Ensayo de barrera ..... - 57 -
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO ..... - 58 -

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN ..... - 60 -

4.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ALMIDÓN ACETILADO ..... - 60 -
4.2. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE PELÍCULAS COMESTIBLES ELABORADAS CON ALMIDÓN NATIVO/HPMC O ACETILADO/HPMC Y CONTENIENDO SORBATO DE POTASIO ..... - 67 -
4.2.1. Características visuales de las películas ..... - 67 -
4.2.2. Parámetros de color de las películas ..... - 69 -
4.2.2.1. Películas elaboradas con almidón nativo – Efecto del contenido de glicerol y HPMC - 69 -
4.2.2.2. Películas elaboradas con almidón acetilado – Efecto del contenido de glicerol y HPMC ..... - 70 -
4.2.3. Espesores de las películas. ..... - 75 -
4.2.4. Ensayo mecánico de tracción ..... - 77 -
4.2.4.1. Películas elaboradas con almidón nativo – efecto del contenido de glicerol y HPMC - 78 -
4.2.4.2. Películas elaboradas con almidón acetilado – efecto del contenido de glicerol y HPMC ..... - 80 -
4.2.5. Contenido de humedad de las películas ..... - 84 -
4.2.6. Solubilidad en agua ..... - 85 -
4.2.7. Permeabilidad al vapor de agua (PVA) ..... - 87 -

4.2.8. Microestructura ..... - 90 -
4.2.8.1. Microscopía óptica ..... - 90 -
4.2.8.2. Microscopía diferencial de barrido ambiental (ESEM) ..... - 91 -
4.2.9. Ángulo de gota en contacto con la superficie ..... - 97 -
4.2.10. Análisis de los espectros FTIR ..... - 99 -
4.2.11. Análisis mecánico dinámico (DMA) ..... - 102 -
4.3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PELÍCULAS COMESTIBLES ELABORADAS CON ALMIDÓN NATIVO/HPMC O ACETILADO/HPMC Y CONTENIENDO SORBATO DE POTASIO ..... - 110 -
4.3.1. Ensayo de difusión en ágar ..... - 110 -
4.3.2. Ensayo de barrera antimicrobiana ..... - 111 -
4.4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PELÍCULAS COMESTIBLES ELABORADAS CON ALMIDÓN NATIVO/HPMC O ACETILADO/HPMC Y CONTENIENDO SORBATO DE POTASIO Y CARVACROL ..... - 113 -
4.4.1. Ensayo de difusión en ágar ..... - 113 -
4.4.2. Ensayo de barrera antimicrobiana ..... - 116 -
4.5. CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS COMESTIBLES ELABORADAS CON ALMIDÓN NATIVO O ACETILADO Y CONTENIENDO SORBATO DE POTASIO Y CARVACROL ..... - 122 -
5. CONCLUSIONES GENERALES ..... - 125 -
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS ..... - 128 -
ANEXO I ..... - 139 -

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Tendencias actuales en empaquetamiento de alimentos

La calidad de los alimentos se encuentra vinculada al grado de excelencia de los mismos. Su evaluación incluye factores tales como: sabor, apariencia y contenido nutricional. La calidad es esencial a fin de lograr la aceptabilidad por parte de los consumidores. Fundamentado en procedimientos de determinación de factores deteriorativos, la calidad global podría incluir aspectos tales como la calidad sensorial, calidad microbiológica y calidad toxicológica. Es importante destacar que la seguridad alimentaria se ha convertido en un tema significativo que involucra no sólo la calidad de la materia prima, y las operaciones de preservación, si no que incluye el empaquetamiento de los alimentos y la logística de distribución (Han, 2012). El mercado actual ha experimentado un incremento en la demanda por los alimentos naturales, ligado al criterio de alta calidad y seguridad. Esto ha guiado a compañías e investigadores a explorar diferentes maneras para mejorar la calidad alimentaria en términos de mantener la frescura y seguridad, así como de utilizar materiales renovables y biodegradables en el empaquetamiento de alimentos (Pérez Espitia y col., 2014).

Los materiales de empaques tradicionales contribuyen a problemas medio ambientales asociados con el consumo de recursos y energía resultando, además, en una corriente de desechos que contaminan el ambiente. Los recursos usados para producir empaques y los problemas resultantes con el manejo de residuos han sido tema de preocupación e investigación ambiental. Hasta ahora, la mayor atención se ha enfocado en minimizar los impactos ambientales asociados con los recursos y la producción de los materiales para empaques, así como en la recuperación del recurso una vez que el envase ha sido descartado. Algunas estrategias han incluido: la selección de materiales renovables para desarrollar materiales de empaquetamiento, la mejora de la eficiencia en la producción, la disminución del consumo de energía asociado y la conversión de los materiales de empaque a otras formas de materiales para disminuir la contaminación del ambiente (Wikström y col., 2014).

En los últimos años, se han introducido nuevos conceptos acerca del empaquetamiento de alimentos. De manera general, dichas innovaciones buscan mejorar, combinar o extender las funciones básicas de los empaques alimenticios

tradicionales que son: proteger al alimento contra contaminaciones o cambios externos; comunicar información importante acerca del contenido del alimento; permitir a los consumidores disfrutar del alimento en la manera que deseen y contener al alimento permitiendo una manipulación y trasporte sencillos.

Dado que el empaquetamiento tradicional encuentra limitaciones en su capacidad para prolongar la vida útil de los productos alimenticios, se ha propuesto un nuevo enfoque, el del *empaquetamiento activo*. El mismo, puede ser definido como un tipo de envase que cambia la condición del producto empaquetado para lograr extender la vida útil o mejorar la seguridad o las propiedades sensoriales mientras mantiene la calidad del alimento. Algunos ejemplos de las estrategias involucradas en el empaquetamiento activo incluyen la incorporación al envase de tecnología de control de oxígeno, etileno o de dióxido de carbono, tecnología de regulación de humedad, antimicrobianos, antioxidantes, tecnología de liberación o absorción de sabores y olores, entre otros (Vermeiren y col., 1999).

1.2. Recubrimientos y películas comestibles

Con el fin de solucionar los problemas generados por los residuos plásticos, se han realizado esfuerzos en la investigación para obtener materiales amigables con el medio ambiente. En consecuencia, los polímeros naturales o biopolímeros han recibido mucha atención debido a estas preocupaciones ambientales. Dentro de estos materiales, se encuentran los recubrimientos y las películas comestibles. Ambos pueden ser definidos como una o más capas delgadas y continúas compuestas por materiales que pueden ser ingeridos por el consumidor. Sin embargo, se diferencian ya que los recubrimientos comestibles se aplican directamente sobre el producto ya sea por inmersión, rociado o pincelado y se forman sobre el mismo mientras que las películas comestibles, se producen separadamente y posteriormente se usan sobre el producto alimenticio (Guo y col., 2014). Tanto los recubrimientos como las películas comestibles pueden prevenir el deterioro de la calidad e incrementar la vida útil de los productos alimenticios ya que actúan como barreras que pueden controlar la transferencia de humedad, oxígeno, lípidos y sabores (Khazaeia y col., 2014). Asimismo, pueden utilizarse como soporte de aditivos y nutrientes; y desempeñar un papel importante en la conservación, distribución y comercialización de alimentos. Su

uso en aplicaciones alimentarias y especialmente en productos altamente perecederos tales como los frutihortícolas, está basado en algunos atributos funcionales particulares que poseen, su costo y disponibilidad (Falguera y col., 2011).

Las películas comestibles deben, en general, ser neutras, es decir, no afectar el sabor, color y aroma de los alimentos a los que se aplican a menos que se persigan objetivos específicos de modificación de estos atributos.

En la **Tabla 1.1**, se detallan algunas funciones de las películas comestibles (Arredondo Ochoa, 2012):

Tabla 1.1. Funcionalidad de las películas comestibles.

- Reducir la pérdida de humedad.
- Reducir el transporte de gases.
- Reducir la migración de lípidos.
- Retener componentes volátiles y de sabor.
- Mejorar las propiedades mecánicas.
- Proveer integridad estructural.
- Evitar o reducir el deterioro microbiano.
- Servir como vehículo de aditivos (sabores, colorantes, antioxidantes, antimicrobianos)

1.3. Materiales usados en la elaboración de películas comestibles

Los materiales que pueden ser usados para elaborar películas comestibles incluyen: polisacáridos, proteínas y lípidos, o una combinación de ellos. También suelen ser usados algunos aditivos, tales como: plastificantes y emulsificantes.

Las propiedades funcionales de las películas comestibles están muy influenciadas por la formulación, la tecnología formadora de la película y las

características de los solventes y aditivos. La celulosa y sus derivados (tales como éteres y esteres), junto con el almidón, son algunas de las materias primas utilizadas para la preparación de películas (Peressini y col., 2003).

En la **Tabla 1.2**, se reseña la formulación de algunos recubrimientos y películas comestibles informadas en bibliografía (Falguera y col., 2011).

Tabla 1.2. Biopolímeros usados para elaboración de recubrimientos y películas.

Componentes	**Referencia**
Carboximetilcelulosa, caseína	Ponce et al., 2008
Gelatina con glicerol, sorbitol y sacarosa	Sobral et al., 2001
Pectina	Maftoonazad et al., 2007
Almidón de mandioca	Kechichian et al., 2010
Almidón de maíz pre-gelatinizado	Pagella et al., 2002
HPMC con ácidos grasos	Jiménez et al., 2010
Almidón de maíz - quitosano - glicerina	Liu et al., 2009
HPMC - aceite esencial del árbol de té	Sánchez-González et al., 2009

1.3.1. Almidón

El almidón es un polisacárido de reserva en la mayoría de los vegetales, y es ampliamente utilizado en la elaboración de películas comestibles. Consta de unidades de α-D-glucopiranosa unidas mediante enlaces α-1,4. Está conformado por dos tipos de cadenas: amilosa y amilopectina. La *amilopectina* es un polímero altamente ramificado, con uniones del tipo α-1,6 en los puntos de ramificación, y con un peso molecular alto (5000 – 30000 kg/mol), mientras que la *amilosa* es un polisacárido de cadena lineal y tiene un tamaño molecular bajo (20 – 800 kg/mol). El contenido de

amilosa se encuentra en alrededor del 20-25% en la mayoría de los almidones (Peressini y col., 2003).

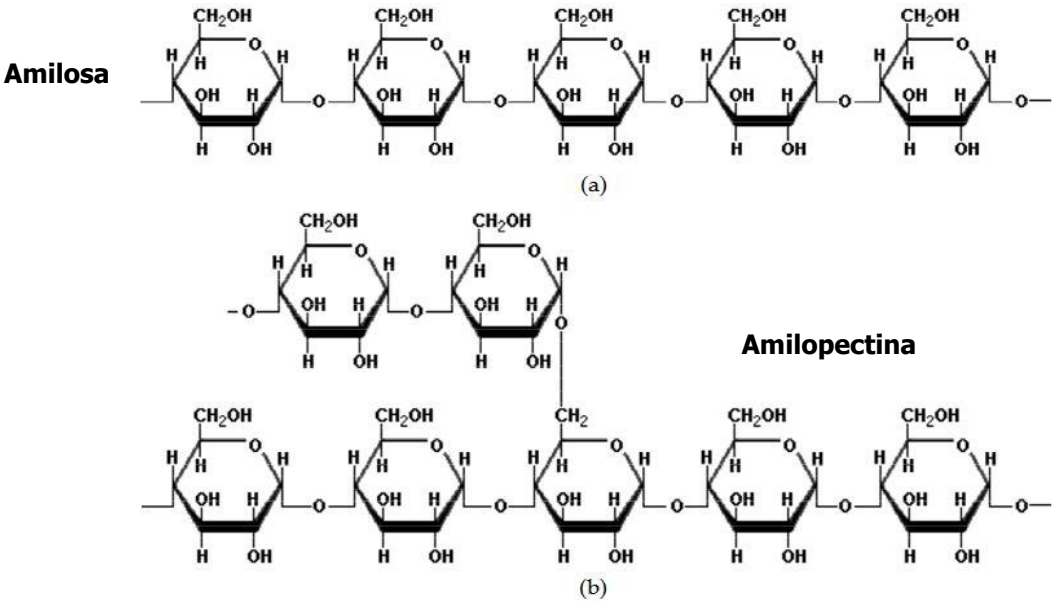

Figura 1.1. Esquema de los componentes del almidón: amilosa y amilopectina.

El gránulo de almidón está formado por capas concéntricas o anillos de crecimiento. En cada capa, las moléculas de amilosa y amilopectina se encuentran entremezcladas y dispuestas de manera radial. Durante el calentamiento de la suspensión acuosa, las moléculas lineales de amilosa y las cadenas laterales externas de la amilopectina se unen a través de puentes de hidrógeno formando micelas (áreas cristalinas). Estas micelas son las responsables de mantener al gránulo unido, permitiendo así el hinchamiento en lugar de la completa ruptura del gránulo y solubilización de las moléculas. A lo largo de una cadena lineal, o en las ramificaciones externas de la amilopectina, pueden existir varias zonas cristalinas, producto de distintas asociaciones intermoleculares locales. Entre estas zonas micelares existen zonas amorfas. El acoplamiento de la posición axial-ecuatorial de las unidades α-D-glucopiranosilo con enlaces α-1,4 en las cadenas de amilosa, da a las moléculas una forma de hélice o espiral con giro a la derecha. El interior de la hélice contiene sólo átomos de hidrógeno y es, por lo tanto, lipofílico, mientras que los grupos hidroxilo están situados en el exterior de la hélice. Cada hélice tiene seis unidades de α-D-glucosa por vuelta. Cuando dos hélices se asocian forman una estructura de doble hélice.

Los gránulos de almidón que no han sufrido tratamiento térmico presentan birrefringencia, lo cual indica un alto grado de orden interno. La birrefringencia es la habilidad de refractar la luz en dos direcciones. Bajo la luz polarizada, los gránulos presentan una marcada cruz de interferencia. La pérdida de birrefringencia indica la pérdida del orden molecular en las zonas cristalinas, micelares, y se usa como criterio de gelatinización. Los gránulos de cada especie de almidón tienen tamaños, formas y superficies característicos (Fanelli, 2009).

La formación de películas comestibles de almidón, involucra la gelatinización de los gránulos de almidón por calentamiento en exceso de agua. Este procedimiento resulta en el hinchamiento y disrupción del gránulo de almidón, así como en la lixiviación de compuestos solubles (amilosa) del gránulo. Una masa viscosa es obtenida, consistiendo de dos fases: una **fase continua** constituida básicamente por la amilosa solubilizada y una **fase discontinua** de gránulos remanentes, principalmente basados en amilopectina. El enfriamiento de la pasta caliente, resulta en la formación de un gel viscoelástico (Flores y col., 2007a).

1.3.1.1. Propiedades del almidón: gelatinización – retrogradación

Cuando los almidones son calentados en un medio acuoso, ocurre la gelatinización convencional (gelación inducida por temperatura). Esta gelatinización ha sido ampliamente investigada y aceptada como un indicador de la destrucción de la estructura cristalina en el granulo de almidón. La gelatinización del almidón es un proceso irreversible e incluye el hinchamiento de los gránulos, una fusión de la fracción cristalina nativa, pérdida de birrefringencia y la solubilización del polímero (Liu y col., 2009). La gelatinización involucra múltiples pasos: la región amorfa en un gránulo de almidón es desestabilizada por la absorción de agua y el hinchamiento, mientras que la región cristalina en el gránulo (principalmente cristales de amilopectina) se funde simultáneamente con el aumento progresivo de la hidratación. Cuando el almidón gelatinizado es mantenido bajo ciertas condiciones, las moléculas de amilopectina fundidas e hidratadas se reorganizan y gradualmente re-cristalizan. El fenómeno de re-cristalización de las moléculas de amilopectina desenrolladas, se conoce como "retrogradación". Este proceso también incluye la cristalización de la amilosa (Kawai y col., 2012).

1.3.1.2. Modificación del almidón: acetilación

La acetilación es uno de los métodos comúnmente usados para estabilizar almidón. Este tipo de modificación es llevada a cabo por esterificación del almidón nativo con anhídrido acético o ácido acético (**Figura 1.2**). Es decir, durante la acetilación, los tres grupos libres hidroxilos ubicados en los carbonos C2, C3 y C6 (de la unidad de anhidroglucosa del almidón) pueden ser reemplazados o sustituidos por grupos acetilo (-$COCH_3$) en una reacción cinéticamente controlada; por lo tanto, el máximo grado de sustitución (GS) teórico que se puede obtener es tres (Colussi y col., 2014). El almidón acetilado puede poseer entonces, tres grados de sustitución (GS): bajo, intermedio y alto. Los almidones acetilados con GS intermedio (0.2 – 1.5) y alto (2 – 3) se caracterizan por su solubilidad en acetona y en cloroformo, y por su termoplasticidad.

Los almidones con un GS entre 0.01 – 0.2 son de gran aplicación comercial ya que, algunas de sus propiedades tales como: unión, adhesión, incremento de espesor, estabilización y textura; son de gran potencial en la fabricación de películas (Luo y Shi., 2012). En los últimos años, los acetatos de almidón han sido usados para la elaboración de materiales biodegradables en envases de alimentos y, a su vez para diversas aplicaciones farmacéuticas. Las propiedades del almidón acetilado dependen de la fuente botánica del almidón, del GS, de la proporción amilosa/amilopectina y de cómo se modificó la estructura molecular del almidón. En la reacción de acetilación, el número de grupos acetilo incorporados en las moléculas del almidón, la tasa y eficiencia, dependen del tipo y concentración del reactivo, el pH, la presencia de catalizador, tiempo de reacción, origen botánico del almidón y las características estructurales y de tamaño del gránulo de almidón nativo (Bello-Pérez y col., 2010).

1.3.1.2.1. Acetilación del almidón aplicando radiaciones de microondas

La energía de las radiaciones no ionizantes de microondas causa un aumento de la temperatura en el interior de un medio penetrado, como resultado de cambios rápidos del campo electromagnético. Cuando una molécula es irradiada con microondas, ésta rota para alinearse a sí misma con el campo aplicado. La frecuencia de la rotación molecular es similar a la frecuencia de la radiación del microondas y por

lo tanto, la molécula continuamente intenta re-alinearse con el campo magnético y la energía es absorbida (Lewandowicz y col., 2000). El potencial de las reacciones asistidas por microondas para la modificación de biomateriales, incluyendo almidones nativos, se ha discutido en los últimos años, particularmente para la esterificación. La ventaja de la reacción asistida por microondas es que proporciona un calentamiento más rápido y uniforme, el cual es económico y amigable con el medio ambiente debido a que se minimizan el consumo de energía, el nivel de toxicidad asociado al uso de solvente, la cantidad de catalizador requerido y los sub-productos de la reacción (Sánchez-Rivera y col., 2013). La esterificación del almidón puede ser acelerada por el calentamiento con microondas dentro de un vaso presurizado ya que pueden alcanzarse altas temperaturas rápidamente. La tasa de reacción de la acetilación puede ser incrementada con la adición de Iodo (I_2) como catalizador, debido a que activa el carbono del carbonilo del anhídrido acético haciendo a este último más reactivo **(Figura 1.2a)**.

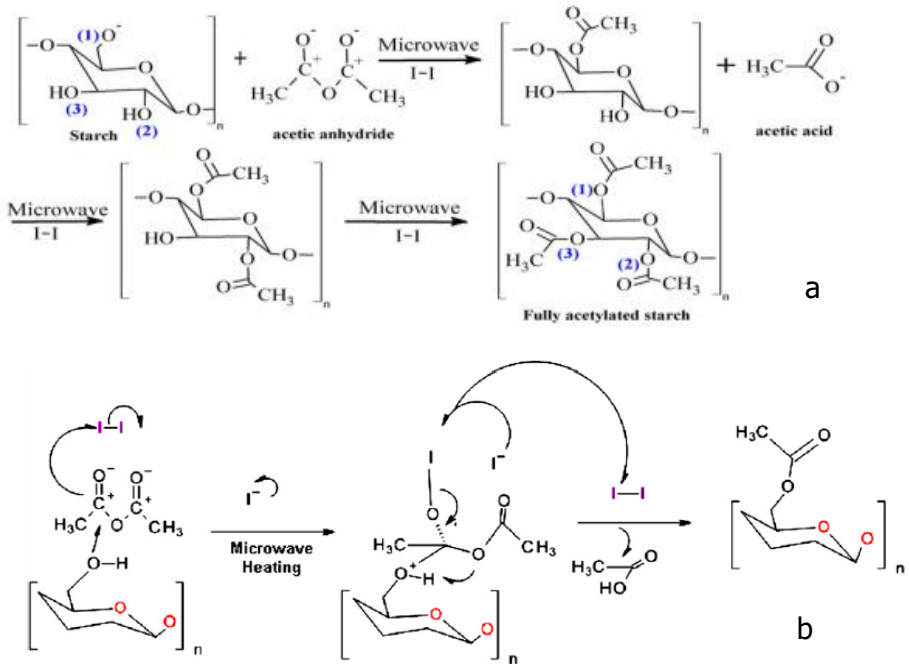

Figura 1.2. a) Esquema de la sustitución de los grupos hidroxilo con grupos acetilo en el almidón durante la reacción de acetilación bajo asistencia de microondas con Iodo como catalizador; b) mecanismo propuesto para la acción catalizadora del Iodo (Khalil Diop y col., 2011).

En la **(Figura 1.2b)** se observa el papel del iodo en la reacción de acetilación: probablemente el Iodo actúa como un catalizador ácido de Lewis, activando el carbono del carbonilo del anhídrido acético y volviéndolo más reactivo; esta combinación anhídrido acético-iodo sólo funciona en ausencia de disolvente. Se ha demostrado que un fuerte catalizador ácido de Lewis como el Iodo, cataliza rápidamente la formación del grupo éster entre alcoholes y anhídridos. Después de la reacción, el Iodo es fácil y estequiométricamente reducido con tiosulfato de sodio para formar ioduro.

Los almidones acetilados son particularmente útiles en la elaboración de fideos, snacks extruidos y recubiertos, productos de panadería y alimentos congelados o listos para consumir almacenados en frío. Liu y col. (1999) reportaron que el contenido de amilosa afecta las propiedades del almidón acetilado aumentando el poder de hinchamiento y la estabilidad a la congelación – descongelación de almidón de arroz no ceroso, pero disminuyendo estas propiedades en el almidón de arroz ceroso. La estructura química fina del almidón acetilado ha sido investigada a partir de diferentes aspectos, por ejemplo, la posición de acetilación en la molécula de glucosa y la distribución de los grupos acetilados en las cadenas de amilosa y amilopectina. El patrón de sustitución de los almidones altamente acetilados es determinado por la técnica de resonancia magnética nuclear (RMN) (Huang y col., 2010).

1.3.1.3. Almidón de mandioca

El almidón de mandioca es un producto que se encuentra en mayor cantidad en América Latina, Asia y África del Sur. En América Latina es popularmente usado como alimento, forraje para animales o es cocinado e ingerido como vegetal y parte de su producción es exportada. Se ha visto que el almidón de mandioca es usado en una extensión mucho menor que otros almidones, como el de maíz, en la industria alimentaria. De cualquier manera, su importancia como fuente de almidón está creciendo rápidamente, especialmente debido a que su precio en el mercado mundial es bajo comparado con otros almidones. Un uso potencial del almidón de mandioca que ha sido previamente considerado, es su aplicación como matriz para el desarrollo de películas comestibles (Flores y col., 2007a).

Los recubrimientos basados en almidón de mandioca son insípidos, inodoros y transparentes, no cambian el sabor, aroma ni la apariencia del producto. Este almidón

es un material abundante y económico, aunque muestra un alto carácter hidrofílico, constituyendo una pobre barrera al vapor de agua. Es por ello que pueden adicionarse lípidos a las formulaciones de las películas comestibles elaboradas con almidón, para reducir la permeabilidad al vapor de agua de las mismas (Chiumarelli y col., 2014). Una de las características de las películas de este almidón es su capacidad de hinchamiento, la cual tiene un efecto pronunciado en la cinética de liberación de antimicrobianos, cuando las películas son usadas como soporte de estos aditivos. En contacto con fluidos, el agua difunde hacia el interior la película, resultando en una relajación de la cadena del polímero con expansión de su volumen; consecuentemente el aditivo se disuelve y difunde fuera del sistema (Flores y col., 2007b).

1.3.2. Celulosa

La celulosa es la sustancia orgánica más abundante en la naturaleza y, el principal componente de las paredes celulares de plantas y algas verdes. Este biopolímero se presenta en la madera en un 40 – 50%, 80% en fibras de lino y 90% en las fibras de algodón (Marchessault y Sundararajan, 1983). La purificación comercial de la celulosa se realiza a partir de las fibras de algodón y de la pulpa de madera, en el primer caso por el alto contenido en este polisacárido y en el segundo, por la accesibilidad de este recurso. En su estado natural, la celulosa es difícil de purificar ya que es insoluble en los solventes comerciales. Así, el aislamiento de la celulosa en su forma pura incluye tratamiento alcalino para la remoción de ceras, proteínas y ligninas. Las pulpas destinadas a la obtención de éteres de celulosa sufren pasos de extracción alcalina adicionales para remover polisacáridos de bajo peso molecular llamados hemicelulosas y aumentar la fracción de la celulosa pura (Coffey y col., 1995).

Químicamente difiere del almidón simplemente por tener uniones β-1,4 en lugar de α-1,4, siendo su monómero la glucosa. Este pequeño cambio se traduce en una gran diferencia en sus propiedades funcionales. La celulosa es un poliacetal de 4-O-β-D-glucopiranosil-D-glucosa ya que la unidad básica consiste de dos unidades de glucosa unidas por unión β-1,4 (Coffey y col., 1995). La configuración β-1,4 da como resultado una estructura lineal y rígida para el polímero (**Figura 1.3**). La relativa abundancia de grupos hidroxilo y la tendencia a formar puentes hidrógeno tanto intra como intercatenarios es la causa de la formación de agregados lineales los cuales

contribuyen a la rigidez de las paredes celulares y a la relativa insolubilidad de la celulosa en los solventes comunes, particularmente el agua.

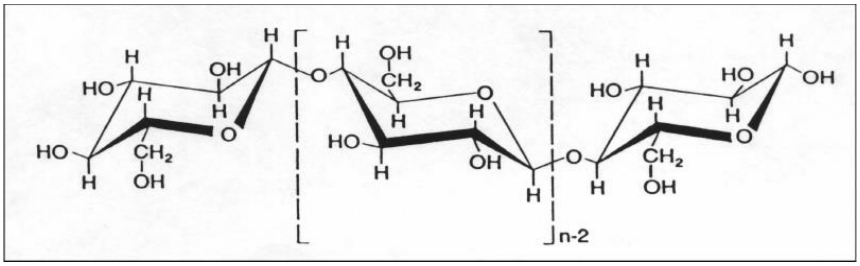

Figura 1.3. Estructura química del polímero lineal de celulosa.

Es posible mejorar las propiedades de la celulosa a través de modificaciones que pueden ser físicas o químicas. Una de las modificaciones físicas más comunes consiste en hacer atravesar una pasta de celulosa por tamices de pequeños orificios bajo condiciones de gran esfuerzo de corte y altas presiones diferenciales (Coffey y col., 1995). Así se obtienen las celulosas microfibriladas las cuales tienen mayor capacidad de retención de agua y son menos propensas a la precipitación. Por modificaciones físicas también se obtiene la celulosa microcristalina que es producida tratando a la celulosa natural con ácido clorhídrico para disolver las regiones amorfas del polisacárido, persistiendo solamente las regiones cristalinas. Estas celulosas generan soluciones donde la viscosidad no varía notablemente con el pH o la temperatura (Brownsey y Redout, 1985).

Si bien existen numerosos derivados obtenidos por modificaciones químicas de la celulosa natural, sólo unos pocos éteres de celulosa han encontrado aplicación en la industria alimentaria. Los derivados más comúnmente usados son la carboximetilcelulosa, metilcelulosa, e hidroxipropil metilcelulosa. Estos dos últimos son empleados debido a la capacidad de formar geles termorreversibles y por sus propiedades interfaciales (Kobayashi y col. 1999; Sarkar y Walker, 1995). Aunque la variedad de éteres de celulosa es amplia, todos ellos son obtenidos esencialmente de igual forma (Kondo, 1993). El proceso de producción puede ser dividido en tres etapas: obtención del álcali de celulosa, alquilación o hidroxialquilación y purificación final del producto.

El peso molecular de estos polímeros se manifiesta en la viscosidad de sus soluciones. Así, a medida que el peso molecular disminuye, la viscosidad disminuye.

Para estos derivados de celulosa, por lo tanto, el peso molecular es una importante información (Coffey y col., 1995).

Además de los sustituyentes presentes en el esqueleto carbonado de celulosa y la viscosidad de sus soluciones, normalmente medidas a concentraciones de 1 o 2% p/v, estos productos se caracterizan por el grado de sustitución (DS) y la sustitución molar (MS). Cada unidad de anhidroglucosa en la molécula de celulosa tiene tres grupos hidroxilos disponibles para la derivatización. De esta manera, si los tres grupos fueran sustituidos el producto tendría un DS igual a 3. Si un número promedio de dos sobre tres hidroxilos totales hubieran reaccionado, entonces el DS sería 2 y así sucesivamente. El término DS se relaciona con aquellos sustituyentes que bloquean los grupos hidroxilos reactivos. Los sustituyentes que permiten el crecimiento posterior de la cadena son caracterizados por la sustitución molar (MS). Es decir, el DS define el número de grupos hidroxilos por unidad de glucosa anhidra en donde el átomo de hidrógeno es reemplazado y MS representa el número promedio de grupos de óxido de propileno por unidad de glucosa anhidra (Nahringbauer, 1995). La derivatización de los grupos hidroxilo reactivos con óxido de propileno genera a su vez sitios hidroxilo disponibles para posteriores reacciones. De esta manera, la reacción continúa con la extensión de la cadena.

1.3.2.1. Hidroxipropil metilcelulosa

La hidroxipropil metilcelulosa (HPMC) es un derivado de celulosa que forma parte de una familia que incluye entre otros a la metilcelulosa (MC), en la cual los sustituyentes son grupos metilo y a la metil hidroxietilcelulosa (MHEC) la que posee como sustituyentes grupos hidroxietilo hasta en un 5%. La HPMC presenta en su cadena grupos metilo e hidroxipropilos (**Figura 1.4**). Difieren principalmente entre sí, en su peso molecular, viscosidad, grado de sustitución (DS) y sustitución molar (MS). A lo largo de la cadena de celulosa, los grupos metilos constituyen zonas hidrofóbicas mientras que los grupos hidroxipropil son más hidrofílicos. La introducción de estos sustituyentes, permite a la HPMC comportarse como surfactante. La utilidad de los éteres no iónicos de celulosa se basa fundamentalmente en cuatro atributos: son espesantes eficientes, presentan actividad superficial, tienen la habilidad de formar películas interfaciales y la capacidad de formar geles termorreversibles. Las

interacciones hidrofóbicas son responsables de la formación de los geles de HPMC durante el calentamiento. A medida que la temperatura aumenta, las moléculas absorben energía traslacional y pierden gradualmente su hidratación, resultando en una menor viscosidad (Coffey y col., 2006). Posteriormente, tienen lugar las interacciones polímero-polímero, debido a interacciones entre los grupos hidrofóbicos, causando así opacidad en la solución y una red infinita que provoca un aumento en la viscosidad (punto de gel) y la turbidez si la concentración es relativamente alta (Sarkar y Walker, 1995).

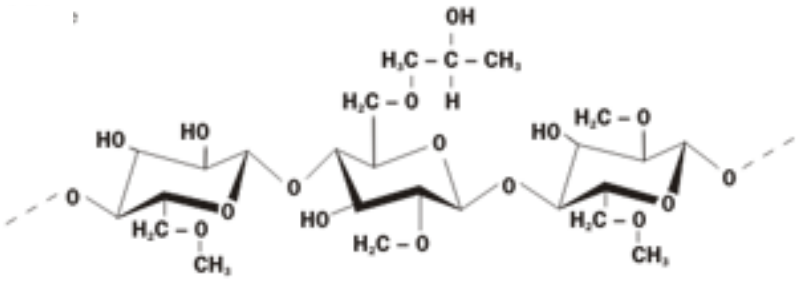

Figura 1.4. Esquema de la molécula de HPMC.

La HPMC es empleada en una gran gama de productos alimenticios, pero también se utiliza en la industria de pinturas, la cosmética y la farmacéutica (Camino, 2010).

1.3.3. Mezclas de biopolímeros en la elaboración de películas

Aunque las películas comestibles basadas en polisacáridos muestran buenas propiedades mecánicas y de barrera al oxígeno, su barrera al vapor de agua y resistencia a la humedad, son pobres debido a su naturaleza hidrofílica. Es por lo anterior, que se obtienen ventajas a partir de la combinación de polisacáridos y lípidos en las películas comestibles. Las películas comestibles basadas en almidón muestran características físicas similares a los polímeros sintéticos, tales como ser transparentes, inodoras, semi-permeables al dióxido de carbono y resistentes al paso del oxígeno. Por otro lado, muestran algunas desventajas tales como su fuerte carácter hidrofílico y pobres propiedades mecánicas. Esto puede ser superado con la adición de celulosas al almidón, lo cual pude ayudar a disminuir la permeabilidad al vapor de agua e

incrementar la fuerza mecánica (Laxmikant y col., 2014). Se han informado estudios, sobre la mezcla de diferentes polisacáridos en proporciones adecuadas con el objetivo de optimizar las propiedades de las películas biopoliméricas resultantes o para disminuir los costos de la producción de nuevos materiales con propiedades innovadoras para ser usadas para propósitos específicos (Espinel Villacrés y col., 2014).

1.3.4. Plastificantes

Los plastificantes más comúnmente usados en películas comestibles son los polioles como por ejemplo glicerol, sorbitol, derivados del glicerol y polietilenglicoles o lípidos y sus derivados por ejemplo fosfolípidos, ácidos grasos y surfactantes. Son generalmente requeridos, en aproximadamente 10 al 60% en relación a los sólidos presentes, dependiendo de la rigidez del polímero. El principal inconveniente de los plastificantes es que disminuyen la cohesión de la película, provocando el incremento en la permeabilidad a los gases, al vapor de agua y solutos.

Los plastificantes pueden ser definidos como compuestos no-volátiles de muy bajo peso molecular adicionados a distintos polímeros para reducir la fragilidad, impartir flexibilidad y mejorar la resistencia de las películas. En el caso específico de películas, los plastificantes reducen el agrietamiento y mejoran la flexibilidad de la misma. En términos generales, estos componentes reducen las fuerzas intermoleculares a lo largo de las cadenas del polímero, lo que aumenta el volumen libre y los movimientos de la cadena (Rungsinee Sothornvit y col., 2005). El glicerol (**Figura 1.5)**, es el plastificante más ampliamente usado para mejorar las propiedades mecánicas y la transparencia de las películas comestibles. Los grupos hidroxilo presentes en el glicerol son responsables de las interacciones inter e intramoleculares (puentes de hidrógeno) en las cadenas poliméricas, proporcionando a las películas una estructura más flexible (Prakash Marana y col., 2013).

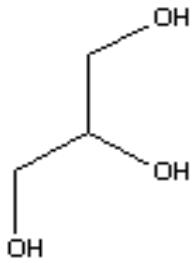

Figura 1.5. Esquema de la molécula de Glicerol.

1.4. Elaboración de las películas

Para la obtención de películas comestibles, en la mayoría de los trabajos reportados, se ha empleado la técnica de casteo. Generalmente, en dicha técnica, los materiales se disuelven adecuadamente en un solvente como agua, alcohol o mezclas de disolventes. También es posible usar agentes plastificantes tales como glicerol, sorbitol, polietilenglicol, oligosacáridos, lípidos y sus derivados para disminuir la fragilidad de la película y mejorar su flexibilidad y extensibilidad. Igualmente se pueden añadir aditivos, tales como saborizantes, agentes antimicrobianos, colorantes y otros en las películas comestibles, y estas estructuras biopoliméricas actúan en estos y otros casos como controladores de la localización o velocidad de liberación de estos aditivos en los alimentos.

De manera detallada, la formación de las películas comestibles usando almidón, involucra en un primer paso, la gelatinización de los gránulos del polímero por el calentamiento en agua. A medida que se aumenta la temperatura, ocurre el hinchamiento y disrupción del gránulo, así como la lixiviación de los componentes solubles (amilosa) del gránulo. Como resultado, se obtiene una masa viscosa que se dispensa en moldes generalmente plásticos o de silicona y se procede a su secado en estufa con convección de aire. Posteriormente, las películas ya formadas son separadas de dicho molde, se estabilizan en atmósfera de humedad controlada y finalmente se realiza la caracterización de las mismas.

Diferentes autores han informado que la composición, el método de formación de la película y las condiciones en el proceso de secado, influyen en el desempeño de las películas basadas en proteínas o almidones. Por lo anterior, es importante estudiar

las propiedades físicas, químicas y mecánicas de las películas comestibles en relación a su composición y procesamiento y estas propiedades se deben poder controlar adecuadamente a fin de obtener películas con las características deseadas y así poder evaluar las ventajas y desventajas de su aplicación en alimentos (Flores y col., 2007a).

1.5. Caracterización físicoquímica de las películas comestibles

Las propiedades físicas de las películas comestibles que contienen almidón de mandioca y glicerol son afectadas por los procesos de gelatinización y secado. Se ha encontrado que estos procesos, afectan las características de la matriz, determinando cambios en dichas propiedades (Flores y col., 2007a). Por otra parte, se ha estudiado la liberación del sorbato de potasio de las películas comestibles basadas en almidón de mandioca con glicerol como plastificante y se concluyó que la alta velocidad de secado empleada en la técnica de casteo, determina la obtención de películas con alto grado amorfo, lo cual contribuye enormemente a la relajación de la matriz para la liberación del sorbato en un medio líquido (Flores y col., 2007b).

La aplicación que tienen las películas hidrofílicas, como las elaboradas a base de almidón de mandioca, está limitada por la solubilidad en agua y la alta permeabilidad. Para resolver esta deficiencia, se ha propuesto la mezcla del almidón con diferentes biopolímeros o la adición de materiales hidrofóbicos tales como aceites o ceras (Chillo y col., 2008).

1.5.1. Estructura física: estado amorfo y estado cristalino

El almidón es un material semi-cristalino. El proceso de obtención de las películas involucra una etapa de gelatinización que conduce a la pérdida de cristalinidad. Sin embargo, la posterior etapa de retrogradación puede conducir a un aumento del grado de cristalinidad.

Las propiedades mecánicas de las películas elaboradas a partir de dicho polímero, dependen de la distribución de las cadenas macromoleculares en la fase amorfa y del grado de cristalinidad. Los cristales, aunque están en menor cantidad que la fase amorfa en las películas de almidón, se comportan como partículas duras o

agentes de reticulación física, tendiendo a rigidizar las películas. Al mismo tiempo, la proporción de amilosa/amilopectina, el plastificante, el contenido de agua y el almacenamiento, pueden afectar las propiedades mecánicas de las películas de almidón, debido al efecto que tienen sobre la temperatura de transición vítrea (Tg) y el grado de cristalinidad.

Con el envejecimiento, los materiales amiláceos usualmente se vuelven más fuertes y rígidos, es decir, menos flexibles, principalmente debido al incremento de la cristalinidad. De acuerdo con Al-Hassan y col. (2012) aunque los módulos de elasticidad y la deformación se mantienen casi sin cambios después de 2 semanas de almacenamiento, el esfuerzo probablemente no se estabilizará hasta pasados 2 meses pues la retrogradación procede durante un largo período.

Básicamente las películas de amilosa muestran propiedades mecánicas mejoradas sobre las películas de amilopectina. Al parecer, el origen del almidón tiene un pequeño efecto sobre las propiedades mecánicas de las películas de amilosa. Incrementar el contenido de amilosa normalmente conduce al mejoramiento de las propiedades mecánicas tales como el esfuerzo a la ruptura y la deformación. Las propiedades mecánicas de las películas de almidón dependen mucho de su contenido de agua, ya que ésta ejerce un efecto plastificante. Las películas con diferentes cantidades de plastificante también contienen diferentes cantidades de agua y todo ello, da lugar a diferencias tanto en la cristalinidad como en la Tg. Se ha demostrado en varios estudios que el esfuerzo a la ruptura o el módulo elástico no disminuyen linealmente, y que la deformación no incrementa linealmente con el contenido de plastificante (Famá y col., 2007; Famá y col., 2006).

1.5.2. Color

El color es un atributo importante de calidad en los alimentos, ya que su evaluación condiciona fuertemente la aceptación por los consumidores y es, por lo tanto, importante su caracterización en relación a la producción y comercialización de los mismos.

El color es una respuesta perceptiva mental al espectro visible de la luz (distribución de la luz versus la longitud de onda) reflejado o emitido por un objeto.

Esta radiación interactúa con la retina del ojo y luego la señal de respuesta es transmitida al cerebro por el nervio óptico, dónde se asignan colores a dicha señal. En alimentos, la apariencia es el criterio primario para tomar decisiones al comprar. La apariencia es usada a lo largo de la cadena de producción, almacenamiento, mercadeo y uso, como el juicio primero de la calidad de un producto. El color es un atributo especialmente importante, ya que brinda la información básica de apariencia para el ser humano y tiene una asociación cercana con factores de calidad tales como frescura, madurez, variedad, atractivo y seguridad alimentaria (Wu y col., 2013).

En la evaluación instrumental del color se utiliza comúnmente un fotocolorímetro para medir la relación entre la luz reflejada por el alimento y por un estándar conocido. Las mediciones se toman a través de una esfera integradora y una red de difracción, en varios puntos, a través del rango visible del espectro electromagnético. Diferentes instrumentos miden con diferentes intervalos de longitud de onda, dependiendo de la naturaleza del analizador espectral y de los componentes electrónicos de control. La reflectancia, entonces, se expresa como un porcentaje o una fracción. Así, un difusor reflectivo perfecto va a tener una reflectancia del 100%. Una muestra negra, en cambio, la cual absorbe toda la luz incidente, va a tener una reflectancia del 0%. En el medio de ambos extremos caen todos los otros colores visibles. Si la muestra absorbe todo menos la luz roja, va a mostrar valores de reflectancia en la zona roja del espectro de reflectancia. El fotocolorímetro "captura" toda la luz reflejada por la superficie a través del rango visible de longitud de onda y, entonces, puede analizar gráficamente e informar cuál será el color percibido.

Para la cuantificación del color, existen sistemas sofisticados como los elaborados por CIE, la Comisión Internacional de Iluminación. Entre ellos cabe destacar el sistema XYZ (valores triestímulo), cuyos parámetros representan los tres colores teóricos rojo, verde y azul que, según se comprobó experimentalmente, son vistos por los observadores. Otro sistema es el CIELab, en el que el valor "L*" mide la luminosidad de la muestra, representando la aproximación matemática de la respuesta del ojo al negro-blanco. Un blanco perfecto tiene un valor de cien (100) y un negro perfecto tiene un valor de cero (0) en la escala L*. El valor "a*" mide la cantidad de rojo / verde presente y el valor "b*", la cantidad de amarillo / azul. De esta manera, los valores "a*" positivos son rojizos, los valores "a*" negativos son verdosos, los "b*" positivos son amarillentos y los "b*" negativos son azulados. La mezcla de todos ellos, unidos al valor de luminosidad "L*", permite identificar y definir todos los matices. Los

sistemas Hunter L, a, b y CIELab (**Figura 1.6**) son similares en organización, pero un dado producto tendrá valores numéricos diferentes en estos dos espacios. Las dos escalas derivan matemáticamente de los valores X, Y, Z.

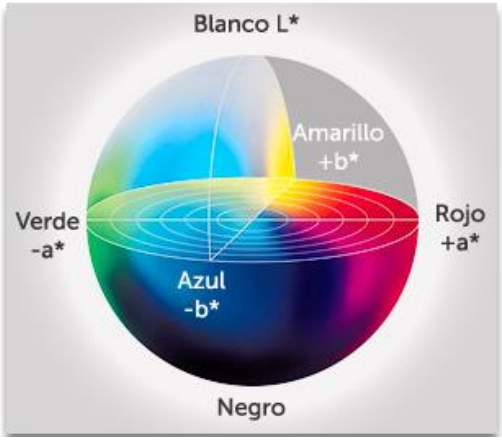

Figura 1.6: Esquema CIELab (http://sellerink.com.br/blog/tag/modelo-cielab/)

Las funciones de color son valores que se obtienen por combinación matemática de los valores triestímulo y que representan los atributos de color, según los distintos espacios cromáticos. De acuerdo a la norma de la "American Standards Test Methods" ASTM D-1925 (1988), se define el Índice de Amarillo (Yellow índex, YI) como:

$$YI = \frac{100}{Y}(1{,}277X - 1{,}067Z)$$

donde X, Y y Z corresponden a los valores triestímulo del espécimen bajo condiciones de iluminante C y observador 2º. Un valor positivo de YI describe la presencia y la magnitud de un componente amarillo, mientras que un valor negativo indica la aparición de un componente azul. Esta ecuación fue, en principio, desarrollada para determinar el grado de color amarillo de ciertos plásticos transparentes no coloreados, plásticos translúcidos u opacos casi blancos.

Otro de los parámetros importantes a la hora de evaluar el color en películas comestibles, es el Índice de blancura. La ASTM definió el índice de blancura para medir materiales opacos cercanos al blanco tales como papel, pintura y plástico. De hecho, este índice puede ser aplicado para cualquier color que parezca blanco. El índice de

blancura definido en la ASTM E313, se usa para determinar en qué grado el color de una muestra se desvía de un blanco ideal.

1.5.3. Comportamiento reológico

La reología es la ciencia que estudia la deformación y flujo de los materiales bajo condiciones definidas. Existen numerosos estudios reológicos efectuados en alimentos que muestran la gran diversidad de comportamientos mecánicos que presentan los mismos y ello se encuentra directamente ligado a la amplia variación en sus estructuras (Martínez, 2005). En función de la dirección de la fuerza que se aplica sobre el producto, los ensayos pueden ser de compresión o tracción/tensión (fuerzas normales) o de cizallamiento (fuerzas tangenciales). Con estos ensayos puede medirse, por ejemplo, la deformación a ruptura, el módulo de elasticidad normal o tangencial, dependiendo del tipo de fuerza aplicada. Además, hay ensayos reológicos que resultan ser una combinación de los primeros: flexión, torsión, punción, compresión con desplazamiento lateral.

Los ensayos aplicados pueden además ser clasificados en dinámicos (estímulo sobre la muestra es de tipo oscilatorio) y cuasi-estáticos (estímulo no oscilatorio). En ambos tipos de ensayos, a fin de independizarse de las características geométricas de la muestra a medir, no se trabaja con fuerzas y elongaciones, sino que se definen tensiones y deformaciones (Aguilera y Stanley, 1999).

1.5.3.1. Ensayos cuasi-estáticos: tracción

De acuerdo con la norma ASTM D882-10, "Método de Ensayo Estándar para Propiedades de Tracción de Láminas Delgadas Plásticas", este ensayo, puede ser usado para determinar las propiedades de tracción de plásticos en forma de láminas o películas delgadas (con espesor menor a 1.0 mm) por medio de una Máquina Universal de Testeo. Las propiedades de tracción determinadas por este ensayo son de valor para la identificación y caracterización de materiales para los propósitos de control y especificación. Las propiedades de tracción pueden variar con el espesor del

espécimen, el método de preparación, la velocidad del ensayo, el tipo de mordazas usadas y la manera de medir la extensión.

Bajo una fuerza aplicada, un material puede fluir o deformarse. El espectro de situaciones posibles es muy amplio. El comportamiento más simple para fluidos, es aquél de los líquidos ideales o Newtonianos. En el extremo opuesto, se encuentran los materiales que no fluyen, sino que se deforman elásticamente, como es el caso de los sólidos ideales o Hookeanos. Entre estas dos situaciones extremas ideales, se encuentra el comportamiento viscoelástico correspondiente a la mayoría de los alimentos (Aguilera y Stanley, 1999).

Para determinar la resistencia a la tensión que presentan los materiales plásticos, se aplica una fuerza en un extremo del espécimen a fin de que el mismo se estire hasta llegar a la ruptura y se evalúa la deformación y la resistencia a la tracción o esfuerzo.

- *Deformación*

La deformación (ε) se define como el cambio de dimensión lineal de un cuerpo por unidad de longitud del mismo. Se expresa como el porcentaje de alargamiento, que es igual a la variación dimensional (Δl) dividida por la longitud original de la muestra (Lo) la cual es constante y corresponde a un valor de 20 mm. Si se quiere expresar este valor en forma porcentual, se multiplica el cálculo por 100, es decir:

$$\%\,\varepsilon = \frac{\Delta l\,(\mathrm{mm})}{\mathrm{Lo}\,(\mathrm{mm})} \times 100 = \frac{L - L0}{L0} \times 100$$

La deformación a la ruptura es la máxima extensión que alcanza el espécimen después de someterlo al estiramiento. Para determinar este parámetro, el espécimen se sujeta a mordazas por los extremos y se estira hasta provocar la ruptura. Debe medirse la distancia entre mordazas al inicio, durante y al final de la prueba para poder así calcular este parámetro.

- *Resistencia a la tracción o esfuerzo*

El esfuerzo o tensión axial (σ, Pa) se define como la intensidad de las fuerzas con las que un cuerpo resiste un cambio en su forma, por unidad de área de aplicación de dicha fuerza. La resistencia a la tracción o esfuerzo en el punto de ruptura puede determinarse aplicando una deformación creciente al espécimen de material sujeto con mordazas, hasta que se termina la medición de la fuerza en el punto de ruptura permite calcular el esfuerzo como:

$$\sigma = \frac{F}{A}\left[\frac{N}{m^2}\right] = \frac{F}{A}[Pa]$$

- *Curvas esfuerzo – deformación*

Para explicar el comportamiento de las películas en un ensayo de tracción, es usual obtener un gráfico de esfuerzo en función de la deformación como el observado en la **Figura 1.7**. La relación entre el esfuerzo y la deformación en la región linealmente proporcional, se denomina Módulo de Young (E) o simplemente módulo de elasticidad:

$$\text{Módulo de Young } E = \frac{\text{esfuerzo (Pa)}}{\text{deformación (mm/mm)}}$$

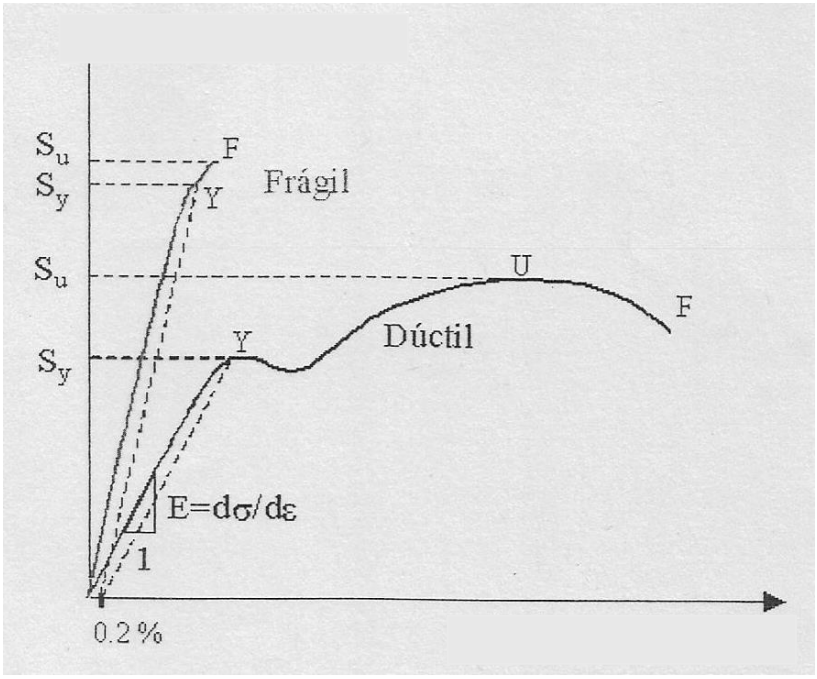

Figura 1.7: Curvas típicas de esfuerzo-deformación (adaptado de Bourne, 1976).

Valores elevados de E, indican que el material es frágil. En general ello implica altos esfuerzos a deformaciones bajas. Cuando el esfuerzo es muy elevado, el material puede quedar permanentemente deformado, es decir que no toda la deformación se recobra cuando se elimina el esfuerzo. Los materiales dúctiles presentan un menor E pues muestran altas deformaciones para los distintos esfuerzos.

1.5.3.2. Ensayos dinámicos

El mecanismo de análisis dinámico consiste en aplicarle al material un estímulo sinusoidal. Si el estímulo es normal, se puede definir una deformación compleja (ε^*) y una tensión compleja (ε^*), siendo:

$$\varepsilon^* = \varepsilon_0 e^{iwt}$$

donde ε_o es la amplitud de deformación, y $w = 2\pi\nu$, la velocidad angular de vibración (siendo ν la frecuencia de vibración) y t es el tiempo de aplicación de la deformación.

Cuando el rango de mediciones es tal que la relación *tensión - deformación* es elástica lineal, la respuesta a la deformación compleja será:

$$\sigma^* = \sigma_0 e^{i(wt+\delta)}$$

donde σ_o es la amplitud máxima de tensión y δ, el ángulo de desfasaje entre la tensión y la deformación al que se lo denomina frecuentemente ángulo de pérdida (Ferry, 1980).

En estos casos, se puede definir el *módulo elástico complejo E*,* parámetro que da la medida de cuán elástico es el material (Ferry, 1980). El mismo, en un medio homogéneo, isótropo y lineal, se calcula de la siguiente manera:

$$E^*(w) = \frac{\sigma^*}{\varepsilon^*} = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} e^{i\delta(w)}$$

El módulo elástico complejo puede también expresarse como:

$$E^*(w) = E' + iE''$$

E' es la parte real del módulo complejo y se lo conoce con el nombre de *módulo de almacenamiento.* Se define como:

$$E' = E^* \cos(\delta)$$

E'' es la parte compleja y se lo denomina *módulo de pérdida.* Se define como:

$$E'' = E^* sen(\delta)$$

E' cuantifica la energía que es almacenada por el material durante la recepción del estímulo, por ejemplo, de compresión y que es liberada, nuevamente, durante la expansión. E'' cuantifica la energía que es disipada, o sea, que es provista durante la compresión pero que se pierde, por ejemplo, durante el reordenamiento molecular. Estas relaciones sólo son utilizadas cuando el material se comporta de forma tal que σ^* y ε^* mantienen una relación lineal, lo que implica que E' y E'' son independientes de ε_o.

Otra propiedad mecánica dinámica fundamental es la tangente de pérdida, dado que ésta vincula la energía disipada con la energía almacenada. O sea:

$$\tan\delta = \frac{Energía\ disipada}{Energía\ almacenada}$$

Ello se expresa como:

$$\tan\delta = \frac{E''}{E'}$$

siendo δ el ángulo entre las componentes en fase y fuera de fase de los módulos en el movimiento cíclico (Li y Larock, 2002).

Para estos estudios se utiliza un equipo llamado Analizador Mecánico Dinámico. Si el estímulo sobre la muestra es sinusoidal y tangencial, los parámetros que se pueden medir son G´ (módulo de almacenamiento) y G´´ (módulo de pérdida) y la tangente de pérdida (tan δ). En este caso, el equipo que se usa para las determinaciones, es un Reómetro Dinámico. El análisis mecánico dinámico (DMA) ha sido una técnica muy usada para la obtención de datos de propiedades térmicas, para componentes poliméricos sencillos, junto con la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Gonzalez y col., 2010) (Triphat y col., 2013).

Este ensayo mide las propiedades mecánicas de un material viscoelástico en función del tiempo, la temperatura o la frecuencia, mientras que el material es sometido a una fuerza oscilatoria periódica. Este método es mucho más sensible que otros métodos y permite evaluar, por ejemplo, la temperatura de transición vítrea de materiales con rellenos o capas delgadas (Gómez García, C. 2012). En métodos tales como el DMA, la transición gomosa-vítrea, está determinada por la caída del módulo de almacenamiento (*E´*), el máximo del módulo de pérdida (E″) o el factor de pérdida (tan δ) a una dada temperatura y es normalmente interpretado como la temperatura asociada a la transición vítrea. Aunque estos métodos (DMA y DSC) no son estrictamente equivalentes, ambos investigan la movilidad molecular a diferentes niveles (Sandoval y col., 2009).

1.5.4. Propiedades térmicas (DSC)

Se trata de una técnica que permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia, cuando es calentada o enfriada a velocidad constante. Es de utilidad para el conocimiento de la estabilidad térmica de un material, así como para la completa caracterización de sus transiciones. Uno de los primeros fenómenos térmicos que suele observarse al calentar un material, es un evento exotérmico, correspondiente a la relajación de las tensiones mecánicas introducidas durante el proceso de fabricación. Otra de las transiciones que experimentan la mayor parte de los materiales vítreos y que puede ser observada por DSC, es la transición vítrea, es decir, el paso del material del estado amorfo vítreo a líquido sub-enfriado. La fusión del material también puede observarse como un evento endotérmico bien definido (Suriñach y col., 1992).

1.5.5. Estructura química

El análisis vibracional de los materiales poliméricos a través de la espectroscopia infrarroja (IR), es un método experimental apropiado para obtener información sobre la estructura química de un material (Pastor y col., 2003). La región IR del espectro electromagnético se encuentra entre 12800 y 10 cm^{-1}. Tanto desde el punto de vista de las aplicaciones como de los equipos, se puede dividir en tres zonas: IR cercano (NIR): 12800-4000 cm^{-1}, IR medio: 4000-400 cm^{-1}, IR lejano: 400-10 cm^{-1}, siendo en el IR medio donde se dan la mayoría de las aplicaciones analíticas tradicionales. Una de las grandes ventajas de la espectroscopia IR es su versatilidad, ya que permite estudiar prácticamente cualquier muestra con independencia del estado en que se encuentre: líquidos, disoluciones, pastas, polvos, fibras, films, gases o superficies son algunos ejemplos, utilizando en cada caso las celdas o soportes adecuados. El material soporte en cuestión debe ser transparente a la radiación incidente, siendo los haluros alcalinos los que más se emplean en los métodos de transmisión (NaCl, KBr, KCl). En comparación con otras técnicas instrumentales, las muestras a analizar requieren poca o ninguna preparación. Basta con moler el sólido en una matriz de KBr o disolver la muestra en un disolvente apropiado (se prefiere CCl_4 o CS_2). El agua debe ser retirada de la muestra siempre que sea posible, ya que tiene una fuerte absorción en la región infrarroja y puede enmascarar las señales de otros

grupos presentes. El tiempo de análisis para obtener un espectro en una muestra rutinaria es de 1 a 10 minutos, dependiendo de la resolución y el número de barridos requerido (Serrano Martínez, 2012). En general, la técnica de medición incluye la aplicación de una transformada de Fourier para el análisis de los datos.

1.5.6. Solubilidad

La solubilidad se define como la medida que indica la cantidad de soluto que puede disolverse en una cantidad determinada de solvente, a una temperatura dada. Esta propiedad es de gran importancia para determinar la funcionalidad de las películas comestibles. Tongdeesoontorn y col. (2011), reportaron que películas fabricadas con 5% (p/p) de almidón de mandioca y (1,5% p/v) de glicerol presentaron una solubilidad del 73% la cual es bastante alta. Otros estudios realizados por Chiumarelli y col. (2012) mostraron que la solubilidad de películas basadas en almidón de mandioca y adicionadas con glicerol varió entre 27,50% y 43,14%, concluyendo que estos valores son adecuados para la aplicación de las películas en frutas frescas cortadas.

Una característica deseable en las películas comestibles es la resistencia al agua, dado que ella contribuye a mantener la integridad de las mismas, en caso que vayan a ser usadas para la conservación de alimentos de humedad intermedia a alta. Una película antimicrobiana con pobre resistencia al agua se disuelve rápidamente en contacto con altos contenidos de humedad, determinando que la película libere el agente antimicrobiano. Sin embargo, estas coberturas podrían utilizarse en alimento listos para consumir donde es deseable un alto porcentaje de solubilidad en la boca (Ozdemir y col., 2008).

1.5.7. Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

De acuerdo con la norma ASTM E96-00, la permeabilidad se define como la tasa de transmisión de vapor de agua a través de una unidad de área de material plano con espesor conocido, inducido por una diferencia de presión de vapor entre dos compartimentos separados por el material, bajo condiciones de presión atmosférica y temperatura definidas. Esta propiedad puede ser útil para entender los posibles

mecanismos de transferencia de masa y las interacciones entre el vapor de agua y el polímero en las películas comestibles.

La diferencia del potencial químico del agua es la fuerza impulsora de la transferencia de agua a través de la película. Cuando el proceso ocurre a temperatura y presión constante, la diferencia del potencial químico del agua es proporcional a la diferencia de la concentración de vapor de agua, entre las dos caras.

La permeabilidad puede ser definida como el producto de la solubilidad y la difusividad cuando las Leyes de Fick y Henry se aplican plenamente. Para la mayoría de las películas comestibles, el vapor de agua interactúa fuertemente con la estructura de la matriz biopolimérica, lo cual resulta en coeficientes de difusión y solubilidad dependientes de la fuerza impulsora (Bertuzzi y col., 2007).

En la **Tabla 1.3,** se muestran valores de PVA para algunos materiales tradicionalmente usados para el envase de alimentos y para películas comestibles (Bertuzzi y col., 2002). Se observa que las películas comestibles presentan valores altos de permeabilidad al vapor de agua (PVA).

Tabla 1.3. Permeabilidad al vapor de agua de películas comestibles y tradicionales.

Películas	**PVA (g/m s Pa)**
Cloruro de polivinilideno	$0,7 - 2,4 \times 10^{-13}$
Polietileno de alta densidad	$2,4 \times 10^{-13}$
Polietileno de baja densidad	$7,3 - 9,7 \times 10^{-13}$
Etilen-vinil acetato	$2,4 - 4,9 \times 10^{-13}$
Poliéster	$1,2 - 1,5 \times 10^{-12}$
Celofán	$7,7 - 8,4 \times 10^{-11}$
Almidón de alta amilosa	$2 - 10 \times 10^{-10}$
Gluten de trigo	$1,4 - 4,6 \times 10^{-9}$
Aislado de proteína de soja	$1,6 - 4,4 \times 10^{-9}$

1.5.8. Hidrofilicidad / Hidrofobicidad

El valor del ángulo que forma una gota de líquido, en contacto con la superficie de las películas, ofrece una indicación del grado de hidrofilicidad / hidrofobicidad de la superficie en cuestión. Dicho ángulo puede variar entre 0 y 180º, siendo un valor menor a 20º indicativo de una superficie hidrofílica, es decir con buena interacción con el agua y un valor mayor a 70º, indicativo de una superficie hidrofóbica.

La energía libre superficial, la cual está directamente relacionada con la humectabilidad, es un parámetro útil que se encuentra fuertemente asociado con las interacciones interfaciales del biomaterial. Por ejemplo, algunas frutas son almacenadas en cámaras frías, donde la humedad relativa puede alcanzar el 95%, y cuando una película es usada como recubrimiento y está sujeta a tales condiciones, podría absorber agua, modificar su interacción interfacial, y perder su aplicabilidad (Rotta y col., 2009).

Las medidas del ángulo de contacto también proporcionan información cualitativa sobre la adhesión de la película después de su fabricación. Una película más hidrofóbica será más compatible con alimentos de alto contenido lipídico.

Es importante destacar que las variables de la formulación de las películas y sus características de superficie poseen gran influencia sobre los ángulos de contacto. En el esquema de la **Figura 1.8**, se muestran la disposición de la gota apoyada sobre una superficie, el ángulo de contacto y las diferentes tensiones interfaciales que quedan determinadas. La tensión interfacial, es una propiedad muy importante en los fenómenos que involucran la presencia de varias fases en contacto. Si predominan las fuerzas de atracción entre las moléculas de un líquido, el ángulo de contacto será alto.

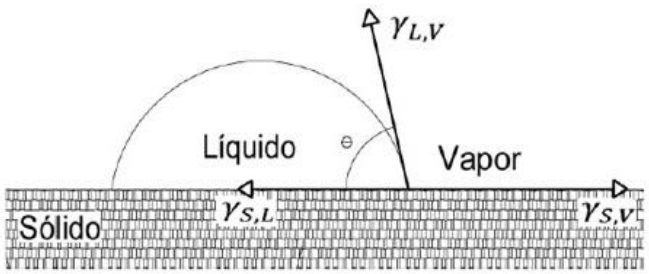

Figura 1.8: Esquema de un sistema de gota sésil en equilibrio. Ángulo de contacto (θ) y tres tensiones interfaciales (Y_{lv}: líquido–vapor, Y_{sv}: sólido–vapor y Y_{sl}: sólido–líquido).

1.5.9. Características microestructurales

La microestructura es considerada una de las características más importantes, junto con otros parámetros, como por ejemplo la composición química, para definir las propiedades y desempeño de materiales, debido a su gran efecto sobre las propiedades físicas. La técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM - ESEM), aporta información importante sobre la microestructura.

- **SEM – ESEM**

El microscopio electrónico de barrido es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica del material analizado. Es muy útil por su alta resolución (~100 Å). En la microscopia electrónica de barrido (SEM) una fina sonda de electrones con energía entre los 3 y los 40 KeV es enfocada sobre una muestra. Varias señales son generadas como resultado del impacto de los electrones incidentes, las cuales son recopiladas para formar una imagen y analizar la superficie de la muestra (Bogner y col., 2007).

1.6. Microorganismos deteriorativos de los alimentos

Los alimentos son susceptibles a la alteración por causa de diferentes géneros de bacterias y levaduras y, a su vez, pueden servir como vehículo de patógenos o sus toxinas. Algunos ejemplos de bacterias usualmente halladas en alimentos se muestran en la **Tabla 1.4** (Carrillo y col., 2007).

Tabla 1.4. Bacterias frecuentemente presentes en alimentos.

Alimentos	Microorganismos
Carnes rojas y aves	*Enterobacter, Listeria, Campylobacter, Aeromonas*
Carnes procesadas	*Bacillus, Clostridium, Lactobacillus, Pseudomonas, Proteus, Sthapylococcus*
Huevos y subproductos	*Aeromonas, Enterobacter, Escherichia, Pseudomonas, Proteus, Salmonella*
Pescados y mariscos	*Aeromonas, Pseudomonas, Proteus, Vibrio*
Leche	*Bacillus, Clostridium, Lactobacillus, Pseudomonas, Sterptococcus*
Frutas y hortalizas	*Bacillus, Clostridium, Pseudomonas*

1.6.1. Bacterias

- *Pseudomonas*

Algunas bacterias psicrotróficas Gram-negativas que pueden multiplicarse en productos cárnicos, productos lácteos y vegetales, tienen influencia sobre la calidad y la vida útil de estos productos, y pueden ser responsables de pérdidas económicas considerables. La principal flora responsable de tal deterioro durante almacenamiento aeróbico es el género *Pseudomonas* (Lebert, y col., 2000). Este grupo de bacterias presenta flagelos polares y, tienen un efecto importante en el deterioro de alimentos conservados a temperaturas de refrigeración como huevos frescos, carne, pescado y leche (Carrillo y col., 2007).

- *Lactobacillus*

Son bacterias lácticas, Gram-positivas, no formadoras de esporas, fermentativas anaerobias facultativas y tradicionalmente usadas para la conservación de una gran variedad de productos fermentados. Este género comprende más de 50 especies diferentes. Además, son versátiles ya que se encuentran en un amplio rango de alimentos incluyendo lácteos, cárnicos y en vegetales fermentados (De Vriesa y col.,

2006). Las especies del género *Lactobacillus* pueden ser anaerobios facultativos o microaerófilos. Se dividen en homofermentativas si degradan glucosa produciendo sólo ácido láctico y heterofermentativas si forman una mezcla de ácido láctico, CO_2, etanol y/o acetato. El ácido láctico disminuye el pH del medio e inhibe el desarrollo de otras bacterias, favoreciendo su adaptabilidad a diferentes hábitats. Aunque el género *Lactobacillus* no afecta negativamente la salud humana, representa problemas y pérdidas para el productor, porque este género puede alterar las propiedades sensoriales en los productos alimenticios. Si la carga es muy alta, pueden alterar el sabor, aroma y la consistencia y el producto puede resultar no comestible para el consumidor (Fialova y col., 2008).

1.6.2. Levaduras

Formando parte del grupo de los hongos, estos microorganismos se caracterizan por ser robustos y capaces de crecer en todo tipo de alimentos, incluyendo cereales, carnes y frutas. Son microorganismos alterantes importantes que pueden causar pérdidas económicas significativas en la industria (Gerez y col., 2013). Las levaduras forman colonias pastosas sobre los medios de cultivo, las cuales están constituidas, en su mayor parte, por células aisladas que suelen ser esféricas, ovoideas, elipsoideas o alargadas. Unas pocas presentan hifas.

Las levaduras se encuentran con frecuencia en hojas y flores. También están sobre la epidermis de las frutas y pueden penetrar a los tejidos subyacentes como resultado de un daño mecánico. Su presencia depende de la temperatura, el pH, la humedad y la disponibilidad de azúcares simples. Las levaduras constituyen la causa más común de alteración de frutas y jugos, pues estos tienen azúcares fermentables. Entre los géneros comúnmente asociados con este deterioro se encuentran *Zygosaccharomyces, Candida, Debaryomyces* y *Pichia* (Carrillo y col., 2007). Las levaduras deterioriativas más conocidas son organismos fermentativos anaeróbicos facultativos que producen etanol y dióxido de carbono a partir de azúcares simples. Algunas levaduras fermentativas son los mayores organismos osmofílicos conocidos, los cuales son capaces de crecer lentamente a actividades de agua tan bajas como 0,6. Los géneros representativos incluyen *Saccharomyces* y *Zygosaccharomyces* (Ollé y col., 2014a). Los efectos negativos de las levaduras en los alimentos, están

relacionados con las características fisiológicas de las mismas, que incluyen su habilidad para multiplicarse a bajas temperaturas, sus actividades metabólicas y su resistencia a los diversos estreses físico-químicos de importancia en preservación de alimentos (Jakobsen y col., 1996).

1.7. Aditivos con acción antimicrobiana usados en películas comestibles

Diferentes preservadores tales como bacteriocinas, ácidos orgánicos, sales y aceites esenciales (EO) de varios extractos de plantas, han sido incorporados en películas y/o recubrimientos comestibles, para proporcionar actividad antimicrobiana (**Tabla 1.5)**. El incremento de la resistencia bacteriana a ciertos antimicrobianos y los esfuerzos para usar preservadores naturales en la producción y almacenamiento de alimentos, ha aumentado el interés en las posibles aplicaciones de los EO y sus constituyentes. Además, estos agentes poseen status GRAS (generalmente reconocidos como seguros), definido por la FDA (Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos).

Tabla 1.5. Diferentes aditivos usados en recubrimientos y películas comestibles.

Aditivo	Efecto	Referencia
Ácido sórbico, ácido benzoico, benzoato de sodio, ácido cítrico	Antimicrobiano	*Quintavalla y Vicini, 2002*
Sorbato de potasio	Antimicrobiano	*Ozdemir y Floros, 2008*
Aceite esencial de té en matriz de HPMC	Antimicrobiano	*Sánchez-González y col., 2009*
Aceites esenciales	Antimicrobiano y Antioxidante	*Atarés y col., 2010* *Sánchez-González y col., 2010*

Los microorganismos, la temperatura, la luz solar, el oxígeno, la humedad, entre otros, son a menudo las principales causas de la pérdida de calidad de productos alimenticios envasados. Estos factores podrían inducir proliferación microbiana en los

alimentos, degradación de los componentes en los alimentos y alteraciones en las propiedades organolépticas con un consecuente rechazo por parte del consumidor. En relación al desarrollo microbiano, en la última década se han enfocado investigaciones y desarrollos a la formulación y estudio del empaquetamiento antimicrobiano (Kurek y col., 2013).

Las películas comestibles que soportan aditivos (ejemplos: antioxidantes, antimicrobianos, etc), con el objetivo de disminuir su destrucción por contacto con el medio, asegurar su gradual liberación y minimizar la cantidad del aditivo a ser usado, se conocen como películas activas (Gerschenson y col., 2016).

El diseño de un sistema de envase antimicrobiano requiere un estudio completo en cuanto a la manera de introducir los compuestos antimicrobianos en las películas de empaquetamiento. En particular, en los últimos años ha aumentado el interés en el uso de extractos y aceites esenciales, obtenidos a partir de plantas aromáticas, para el control del crecimiento de microorganismos patógenos y de la formación de toxinas en alimentos.

1.7.1. Carvacrol

El carvacrol (**Figura 1.9**), es un monoterpeno fenólico y constituye el aceite esencial de algunas plantas aromáticas y especias tales como el comino negro (*Nigella sativa* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.). Es uno de los constituyentes más importantes del aceite esencial del orégano y se ha encontrado que es un eficiente agente antimicrobiano.

Los efectos antimicrobianos y antifúngicos del carvacrol, han sido probados sobre muchos microorganismos incluyendo *Escherichia coli, Pseudomonas fluorescens, Staphylococcus aureus, Lactobacillus plantarum, Bacillus subtillis, Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* (Homayouni y col, 2017; Higueras y col, 2015; Tunç y Duman, 2011).

La efectividad de las películas antimicrobianas está determinada en parte por la tasa de liberación de los componentes antimicrobianos. Una liberación muy lenta provocaría que el crecimiento microbiano no sea suficientemente inhibido; por otro lado, una liberación muy rápida impediría que la inhibición se sostenga en el tiempo.

La tasa de liberación depende del tipo de polímero, el método de elaboración de la película, las interacciones entre los materiales antimicrobianos y el polímero y las condiciones ambientales (Tunç y col., 2011).

Los aceites y extractos de plantas presentan, en general, una actividad inhibitoria contra ciertos microorganismos de importancia en alimentos. Considerando el gran número de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales, es importante aclarar que su actividad antimicrobiana no se atribuye a un mecanismo específico. Los componentes de los aceites esenciales: timol, carvacrol y eugenol, los cuales son compuestos fenólicos, poseen fuertes propiedades antimicrobianas contra diversos microorganismos de interés en alimentos; su mecanismo de acción se podría comparar con el de otros compuestos fenólicos, provocando desorden de la membrana citoplasmática, rompimiento de la fuerza motriz del protón, flujo de electrones y coagulación del contenido celular. Otra característica importante de los aceites esenciales es su hidrofobicidad, la cual permite la separación de los lípidos de la membrana celular y la mitocondria, desordenando la estructura y haciéndola más permeable, lo que permite la filtración de iones y otros contenidos celulares (García-García y col., 2008).

Por lo tanto, el uso de carvacrol como agente activo podría proporcionar una adecuada protección antimicrobiana. Su inclusión en películas resulta interesante pues, al no estar incorporado en el seno del alimento, se reducirían las interacciones con otros componentes del alimento y con factores externos (oxígeno, luz, humedad medioambiental) lo cual colaboraría a una mayor eficiencia de dicho compuesto. El uso de una menor cantidad, asimismo, colaboraría a la obtención de propiedades organolépticas adecuadas (Arrieta y col., 2014).

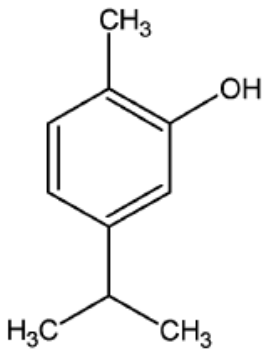

Figura 1.9. Molécula de carvacrol.

1.7.2. Ácido sórbico y sorbato de potasio

Dentro de los aditivos antimicrobianos más ampliamente usados en alimentos, se encuentra el ácido sórbico (ácido 2,4-hexadienoico) y su sal (sorbato de potasio, KS, **Figura 1.10**), comúnmente nombrados en conjunto como sorbatos. El KS es un compuesto GRAS (generalmente reconocido como seguro), de alta solubilidad en agua.

En estudios realizados por (Flores y col., 2010; Vásconez y col., 2009; Chillo y col., 2008; Flores y col., 2007; Famá y col., 2005) se encuentran reportados distintos estudios sobre películas y recubrimientos comestibles conteniendo sorbatos. Ellos se desarrollan para inhibir el crecimiento de levaduras en sistemas alimenticios.

La aplicación de películas comestibles con estos antimicrobianos podría ayudar a obtener un efecto funcional localizado en la superficie del producto alimenticio y/o contribuir a producir una liberación gradual del antimicrobiano, controlando su difusión al alimento y/o proteger al aditivo de la interacción con otros componentes o factores ambientales, las cuáles podrían promover su destrucción o inactivación (Arismendi y col., 2013). Su acción inhibitoria está fuertemente influenciada por el tipo de alimento, las condiciones del procesamiento y almacenamiento y el nivel de preservador. Los sorbatos son estables en su forma seca, pero en soluciones acuosas sufren una degradación oxidativa que depende del pH, la actividad de agua (a_w), presencia de otros aditivos, las condiciones de almacenamiento y procesamiento. La degradación del sorbato está acompañada por un incremento concomitante en las concentraciones de carbonilos, principalmente acetaldehídos y β-carboxiacroleína, la cual influye en el desarrollo del pardeamiento no enzimático (Campos y col., 2000).

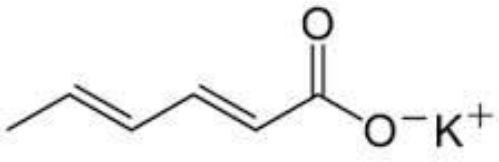

Figura 1.10. Esquema de la molécula de sorbato de potasio.

El soporte de KS en películas comestibles antimicrobianas ha sido estudiado por varios autores y se ha demostrado la efectividad funcional de las mismas. Flores y col., (2007b) estudiaron el desempeño de películas basadas en almidón de mandioca

portadoras de sorbato y establecieron que las películas fueron efectivas, controlando el crecimiento de la población de *Z. bailii*, actuando como agente liberador del preservador o como barrera frente a la contaminación externa por levaduras. A pH ácido, el ácido sórbico es efectivo ya que la molécula lipofílica no disociada es libremente permeable a través de la membrana celular. Posteriormente, al encontrarse con un pH más alto en el interior de la célula, la molécula se disocia resultando en la liberación de aniones y protones, los cuales no pueden atravesar la membrana plasmática. Se ha propuesto que la inhibición del crecimiento microbiano, puede ser debido a diferentes acciones como la alteración de la membrana, la inhibición de las reacciones metabólicas esenciales como la glicólisis, la inducción de una respuesta elevada al estrés energético o la acumulación de aniones tóxicos (Kralj y col., 2001).

1.8. Caracterización de la actividad antimicrobiana de las películas

La utilización de películas comestibles soportando preservadores permite combinar la acción antimicrobiana con la barrera al oxígeno y, aunque en menor medida, con la barrera al vapor de agua que ejerce la película biopolimérica. Asimismo, la película podría aportar a la cohesividad del alimento (Barzegar y col., 2014). Para elegir un antimicrobiano, es importante considerar varios factores, entre ellos, su eficacia contra el tipo de microorganismo problema, las posibles interacciones entre los antimicrobianos adicionados y otros componentes de los alimentos que se encuentren presentes. Las interacciones del antimicrobiano con el biopolímero constitutivo de la matriz de la película, también deben considerarse pues ellas podrían modificar la actividad del antimicrobiano y las características de la película. Considerando que los empaques comestibles antimicrobianos son una nueva tecnología con potencial para colaborar a la preservación de los alimentos, se estudia habitualmente su desempeño mediante dos ensayos, que se explicarán a continuación.

1.8.1. Ensayo de difusión en ágar

También llamado ensayo del halo, consiste en colocar un disco de película conteniendo el antimicrobiano a estudiar, sobre una placa con ágar inoculado y, luego de la incubación en condiciones específicas, se mide el diámetro de la zona clara de

inhibición donde no hubo crecimiento. Esta prueba generalmente se aplica para comprobar si el preservador puede difundir desde la película, estando de esta manera disponible para actuar como agente antimicrobiano.

En este ensayo, la difusión de los antimicrobianos desde la película en estudio hacia el ágar, depende del tamaño, la forma y la polaridad de la molécula de antimicrobiano, así como de las características estructurales y físicoquimicas de la película.

Esta metodología es ampliamente usada para determinar la susceptibilidad de distintos microorganismos frente a diferentes compuestos químicos, incluyendo algunas drogas. Este método es simple, económico requiere poca preparación y no necesita equipo especializado y, una gran ventaja, es que usa pequeñas cantidades del componente a evaluar (Ventura y col., 2012).

En un estudio realizado por Iturriaga y col. (2012) se evaluaron las actividades antimicrobianas de distintos aceites esenciales mediante el método de difusión en ágar. Los autores demostraron que los aceites esenciales de orégano y tomillo, fueron los más efectivos para la inhibición de *L. innocua.* En el caso de la bacteria *P. fluorescens*, los aceites esenciales del tomillo, orégano y clavo fueron más activos, teniendo el mismo grado de efectividad contra esta cepa. En otro estudio llevado a cabo por Souza y col. (2007), se demostró la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de orégano frente a distintos géneros de levaduras mediante el ensayo de difusión en ágar Sabouraud, concluyendo que la concentración mínima inhibitoria (MIC) de dicho aceite, para la mayoría de las cepas evaluadas fue de 10ul/ml y que, además, el aceite esencial de orégano tuvo un efecto inhibitorio substancial sobre todas las cepas evaluadas, confirmándose ello por la observación de importantes halos de inhibición de crecimiento.

1.8.2. Ensayo de barrera

Este ensayo es útil para simular la contaminación microbiana superficial post-proceso de un alimento preservado cubierto con la película. Involucra, la evaluación en el tiempo, de la población microbiana inoculada en la superficie de un disco de película en contacto con un medio sólido (ágar) que actúa como modelo de un producto

alimenticio determinado. Los resultados obtenidos permiten la evaluación de la capacidad de barrera de la película para evitar una contaminación externa (Campos y col., 2011). Estudios realizados por Vásconez y col., (2009) mostraron el desempeño de películas comestibles portadoras de KS, fabricadas a partir de almidón de tapioca y quitosano, con el fin de prevenir la contaminación externa por *Z. bailii* en un producto de alta actividad de agua (a_w: 0,98) y pH reducido. Estos autores observaron que las películas basadas en almidón de tapioca-quitosano o quitosano-tapioca-KS redujeron el recuento de la levadura hasta 3 ciclos log por debajo del sistema control (película libre de preservadores).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

- Contribuir a la obtención de alimentos industrializados saludables, a través del desarrollo de materiales comestibles que actúen como soporte de antimicrobianos.

2.2. Objetivos Específicos

- Desarrollar películas comestibles a partir de almidón de mandioca nativo o modificado químicamente e hidroxipropil metilcelulosa y plastificadas con distintos niveles de glicerol, las cuales puedan actuar como soporte de antimicrobianos como sorbato de potasio y/o carvacrol.
- Analizar la influencia de la formulación y del tipo de almidón sobre las características fisicoquímicas de los materiales desarrollados.
- Estudiar cómo las variables de composición y tipo de almidón influyen en la efectividad del preservador para controlar la contaminación microbiana.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales utilizados se detallan en cada apartado.

3.1. Proceso de modificación del almidón nativo (acetilación) aplicando radiaciones de microondas.

Para la obtención del almidón modificado, se utilizaron los siguientes reactivos:

- Almidón de mandioca nativo (Bernesa S.A, Buenos Aires, Argentina)
- Iodo (Anedra, Buenos Aires, Argentina)
- Anhídrido Acético (Sintorgar, Buenos Aires, Argentina)

Siguiendo los ensayos realizados por Biswas (2008), se pesaron 10,25 gramos de almidón nativo de mandioca en un reactor de teflón. A estos se le adicionaron 19,1 ml de anhídrido acético y se mezcló vigorosamente con una varilla de vidrio por varios minutos. A continuación, se agregaron 0,05 gramos de iodo (I_2) con agitación constante manual con varilla de vidrio hasta lograr una dispersión completa en la mezcla.

Las condiciones de uso del microondas (Milestone - Ethos Plus; Italia) fueron: potencia máxima aplicada 450 Watts, rampa de temperatura (1 minuto para alcanzar una temperatura máxima de, aproximadamente, 100°C; 3,5 minutos de mantención de la muestra a esa temperatura y, finalmente, 1 minuto de ventilación como norma de seguridad en relación a la radiación no ionizante).

Una vez que la mezcla fue enfriada a temperatura ambiente, se adicionaron 4 ml de $Na_2S_2O_3$ a fin de reducir el I_2 a ioduro. Para el proceso de lavado, la mezcla anterior se transfirió a un vaso de 500 ml, conteniendo 150 ml de etanol, y se dejó en agitación por 30 minutos. Posteriormente se filtró mediante embudo Buchner recubierto con membrana de fibra de vidrio bajo vacío. Se lavó transfiriendo el producto sólido a un vaso conteniendo 100 ml de agua destilada y mezclando sobre agitador magnético (Velp Scientifica, Italia), durante 10 minutos. El lavado con agua se repitió 3 veces, filtrando siempre al final del tiempo de agitación. Por último, se realizó un lavado con 100 ml de etanol 96% (v/v), se filtró y la masa obtenida se secó en estufa de vacío a 60°C durante toda la noche. El producto seco fue molido hasta una granulometría inferior a 400 μm.

3.2. Determinación del grado de sustitución del almidón acetilado

Para la determinación del grado de sustitución (DS), se usó una técnica volumétrica (Han, 2013; Bello-Pérez y col., 2010; Sodhi y Singh, 2005). Para ello, se pesó ~1,0000 gramo de la muestra del almidón acetilado, se colocó en frascos Erlenmeyer de 250 ml y se le adicionaron 50 ml de una solución acuosa de etanol al 75% v/v. La mezcla anterior se agitó durante 30 minutos en agitador magnético (Velp Scientifica, Europa) provisto de platina calefactora manteniendo una temperatura de 50°C. Una vez enfriado el sistema a temperatura ambiente, se adicionaron 20 ml de una solución de NaOH 0,5N. Los erlenmeyers bien cubiertos, se dejaron agitando durante 24 horas a temperatura ambiente a fin de proceder a la saponificación con liberación de los grupos acetilo. El exceso de álcali se tituló con HCl 0,5N usando fenolftaleína como indicador. También se preparó una muestra blanco, a partir de almidón nativo. El porcentaje de acetilos fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%\ \text{Acetilos} = \left[\frac{(\text{ml blanco}) - (\text{ml muestra}) \times \text{Molaridad HCL} \times 0{,}043 \times 100}{\text{peso de la muestra (g)}}\right]$$

Siendo (ml blanco) el volumen de HCl 0,5N consumido para la muestra de almidón nativo en la titulación, (ml muestra) el volumen de HCl 0,5N consumido por la muestra de almidón acetilado, en la titulación; y 0,043 corresponde a la masa en miliequivalentes del grupo acetilo (Han y col., 2013; Biswas y col., 2008).

El DS es definido como el número promedio de sitios –OH donde el H ha sido sustituido por grupos acetilo ($-COCH_3$), por unidad de glucosa (valor máximo 3) y se calcula como:

$$DS = \frac{(162 \times \%\ \text{acetilos})}{[4300 - (42 \times \%\ \text{acetilos})]}$$

Donde 162 corresponde al peso molecular de la unidad de anhidro glucosa; 4300 es el producto de 100 por el peso molecular del grupo acetilo, 42 equivale al peso molecular del grupo acetilo – 1 y el % de acetilo es el valor obtenido a partir del procedimiento antes descripto (Han y col., 2013; Bello-Pérez y col. 2010).

3.3. Caracterización de almidón nativo y acetilado

3.3.1. Distribución del tamaño de partícula (dispersión estática de luz)

El tamaño de las partículas fue caracterizado en un equipo de dispersión estática de luz (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Inglaterra), provisto con un láser He- Ne (λ: 633 nm) y con una unidad de dispersión Hydro 2000MU. Las muestras se suspendieron en agua ultrapura hasta conseguir un nivel de obturación de aproximadamente 12% en el equipo. La velocidad de dispersión de la muestra fue de 1800 RPM. Los equipos Malvern generan diferentes parámetros para la interpretación de resultados y entre los más reportados se encuentran:

- D (3,2) Diámetro medio en área de superficie: es el diámetro de la superficie media ponderada, asumiendo partículas esféricas del mismo área de superficie que las partículas reales.

- d(0.1), d(0.5) ó d(0.9): valores de tamaño de partícula indicando que, respectivamente, el 10%, 50% y 90% de la distribución de tamaños de la muestra se encuentra por debajo de este valor (Catálogo del Malvern Zetasizer, Malvern Instruments, Ltd. 2004).

3.3.2. Microscopia electrónica de barrido ambiental (ESEM)

Se obtuvieron las micrografías de las partículas de almidón obtenidas, utilizando un microscopio electrónico de barrido ambiental XL 30 ESEM (Philips, Holanda). Las partículas fueron montadas sobre el portamuestra del equipo con ayuda de cinta de carbono de doble faz. Las imágenes fueron obtenidas sin tratamiento previo de la muestra.

3.3.3. Espectroscopia infraroja con transformada de fourier (FTIR)

El análisis de los grupos funcionales presentes en las muestras (estructura química), fue realizado a través de la identificación de los mínimos de transmitancia de los espectros infrarrojos. Se utilizó un espectrómetro FTIR (V5.3.1 Spectrum, Perkin

Elmer Inc., USA), empleando la técnica de drift a partir de las muestras en estado sólido y su mezcla con KBr. Los espectros se obtuvieron entre 400 y 4000 cm^{-1} con una resolución de 2 cm^{-1}.

3.3.4. Difracción de rayos X

Se utilizó un difractómetro Philips X-ray con goniómetro vertical (radiación Cu $K\alpha,\lambda$=1,542 Å). Las determinaciones fueron realizadas a 40 kV y 40 mA. Las muestras de almidón nativo y acetilado en polvo fueron montadas sobre un porta muestras de vidrio y colocadas en el contenedor del equipo. La intensidad de la difracción de los rayos X fue registrada con un contador de centelleo en un rango de ángulo de dispersión (2θ) de 3-30° utilizando una velocidad de barrido de 1 °/min.

3.3.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Para la determinación de la temperatura y entalpía de gelatinización de los almidones, se utilizó un equipo TA 5000 (TA Instruments, New Castle, Delaware, USA) Modelo Q100 V9.9, con accesorio de refrigeración bajo atmósfera de nitrógeno (50ml/min). Las muestras (~5-6 mg) se pesaron en cápsulas de aluminio, se hidrataron en la cápsula en una relación sólido: agua 1:4 y se cerraron herméticamente. Las muestras se estabilizaron durante 24 h a temperatura ambiente a fin de asegurar la correcta hidratación del almidón. La tasa de barrido fue de 10°C/min, calentando desde 10 °C a 105 °C. Se usó una cápsula vacía como referencia. Se registró la curva de absorción de calor en función de la temperatura para cada muestra. La temperatura de gelatinización fue definida como el mínimo observado en los termogramas usando el Software Universal Analysis 2000 V4.2E 2005para Windows (TA Instruments-Waters, LLC, USA).

3.3.6. Solubilidad y retención de agua

Para la determinación de la solubilidad de las distintas muestras obtenidas, se agregaron ~ 0,1g de almidón junto con 9 g de agua destilada en un tubo Falcon de

peso conocido. Se colocaron las muestras en un baño a 85ºC durante 30 min con agitación cada 5 min. Luego, se centrifugó 10 minutos a 5000 rpm a 25°C. El sobrenadante (5 mL) se traspasó a una placa de Petri de peso conocido y se determinó el peso seco de la muestra por secado en estufa a 100°C. La solubilidad (S, %) se informa como la relación porcentual entre el peso seco obtenido a partir del sobrenadante y la masa inicial de almidón utilizada. A su vez, se determinó el peso del almidón hinchado y, a partir de la diferencia de peso porcentual respecto al peso inicial, se obtuvo el porcentaje de retención de agua.

3.4. Elaboración de las películas

3.4.1. Materiales

En la fabricación de las películas comestibles se utilizaron como biopolímeros:

- Almidón de mandioca nativo (Bernesa S.A, Buenos Aires, Argentina)

- Almidón de mandioca acetilado (obtenido en el presente trabajo)

- Hidroxipropil metilcelulosa (HPMC Methocel Premium® Dow Chemical Co., K4M. 99%<100 mesh, Midland, Michigan, USA).

Todas las soluciones fueron elaboradas con agua destilada. Como agente plastificante se utilizó glicerol (Sintorgan®, Buenos Aires, Argentina) y como agentes antimicrobianos se emplearon sorbato de potasio (KS) y carvacrol (Sigma®, St Louis, MO) calidad analítica.

3.4.2. Películas conteniendo KS

La **Tabla 3.1** muestra la composición de los distintos sistemas estudiados. En todos los casos, la masa total de la solución formadora de las películas preparada fue de 300 g. La concentración final de sorbato de potasio fue 0,3% en todos los sistemas.

Tabla 3.1 Composición (g/100 g totales) de las soluciones formadoras de películas conteniendo KS 0,3 g/100 g.

SISTEMA	ALMIDÓN NATIVO	ALMIDÓN ACETILADO	HIDROXI PROPIL METIL CELULOSA	GLICEROL
S1 (AN3,34 H0 G1,67)	3,34	0	0	1,67
S2 (AN2,67 H0,67 G1,67)	2,67	0	0,67	1,67
S3 (AN2 H1,34 G1,67)	2	0	1,34	1,67
S4 (AN3,34 H0 G0,85)	3,34	0	0	0,85
S5 (AN2,67 H0,67 G0,85)	2,67	0	0,67	0,85
S6 (AN2 H1,34 G0,85)	2	0	1,34	0,85
S7 (AA3,34 H0 G1,67)	0	3,34	0	1,67
S8 (AA2,67 H0,67 G1,67)	0	2,67	0,67	1,67
S9 (AA2 H1,34 G1,67)	0	2	1,34	1,67
S10 (AA3,34 H0 G0,85)	0	3,34	0	0,85
S11 (AA2,67 H0,67 G0,85)	0	2,67	0,67	0,85
S12 (AA2 H1,34 G0,85)	0	2	1,34	0,85

AN: Almidón nativo; AA: Almidón acetilado; H: Hidroxipropil metilcelulosa y G: Glicerol.

Para la fabricación de las películas comestibles se empleó la técnica de casteo. Se prepararon dos soluciones por separado: la primera, consistió en una mezcla de almidón de mandioca, glicerol, KS y agua. Estos ingredientes se colocaron en un vaso de 500 ml sobre agitador magnético. Al mismo tiempo, se preparó la segunda solución que contenía HPMC y agua en un frasco de 1000 ml. Esta última solución se llevó a una temperatura final de 82 °C, usando una rampa promedio de calentamiento de 1,3 °C/min para lograr la gelación de la HPMC. Posteriormente, la solución de almidón se adicionó a la de HPMC a fin de integrar ambos biopolímeros. Debido a la acción anterior, la temperatura de la mezcla descendió a 50-60 °C; se continuó con el calentamiento nuevamente hasta 82 °C a una velocidad promedio de 1,0 °C/min a fin de gelatinizar el almidón. En la **Figura 3.1** se muestran los gráficos de temperatura (sensada con termocupla) vs tiempo, obtenidos en el proceso de gelatinización de las soluciones formadoras de películas.

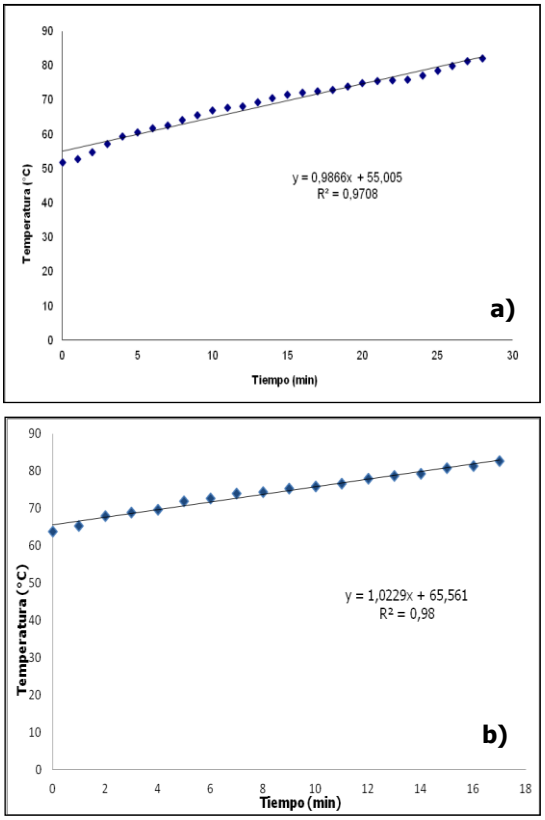

Figura 3.1. Curvas de temperatura versus tiempo para las distintas soluciones formadoras de película: a) Almidón Nativo mezclado con HPMC) y b) Almidón acetilado mezclado con HPMC.

Posteriormente, se eliminaron las burbujas de aire en la solución final obtenida, mediante aplicación de vacío durante unos 3 minutos, a temperatura ambiente y, se vertieron 20 g de la solución formadora de películas sobre placas de Petri de plástico de diámetro 8,7 cm. El proceso de secado se llevó a cabo en una cámara de convección forzada de aire (SEMEDIC, Argentina) a 35°C por 24 horas. Una vez constituidas, las películas fueron separadas de la placa de Petri y se estabilizaron a 25°C durante 15 días, en atmósfera de HR 57,6% generada dentro de un desecador conteniendo una solución saturada de bromuro de sodio (Anedra, Argentina), previamente a la evaluación de sus propiedades.

3.4.3. Películas conteniendo KS y carvacrol

En la **Tabla 3.2** se detalla la composición de los sistemas elaborados con KS y carvacrol. Las cantidades de almidón nativo o acetilado, glicerol y HPMC fueron seleccionadas de acuerdo a los resultados obtenidos en el desarrollo de la tesis.

Tabla 3.2 Composición (g/100 g totales) de las soluciones formadoras de películas conteniendo KS y carvacrol

SISTEMA	ALMIDÓN NATIVO	ALMIDÓN ACETILADO	HPMC	GLICEROL	KS	CARVACROL
S13	2,67	0	0,67	1,67	0,3	0,2
S14	2,67	0	0,67	1,67	0,3	0,5
S15	0	2,67	0,67	1,67	0,3	0,5

Para la elaboración de estas películas, se llevó a cabo un protocolo de trabajo similar al descripto en el **ítem 3.4.2**. El agregado de carvacrol a la solución formadora de películas, se realizó luego de la gelatinización del almidón y, posteriormente, se homogeneizó en un equipo Ultra Turrax (Ika, Alemania) a 21000 rpm durante 2 minutos. En este caso, las burbujas de aire fueron eliminadas por centrifugación (Eppendorf, Alemania) a 500 rpm durante 5 minutos. El casteo de las soluciones,

secado y estabilización, fueron similares a los realizados para las películas con KS solamente.

3.5. Caracterización fisicoquímica, mecánica y estructural de las películas comestibles.

3.5.1. Color

Para la determinación de color se utilizó el fotocolorímetro Minolta CM-508d (Minolta, Japón) con un diámetro de abertura de 1,5 cm. El equipo fue calibrado con placas blanca y negra como patrones; se seleccionó el iluminante D65 y un ángulo de observador de 2°. Se obtuvieron los parámetros CIELab (L*, a*, b*) y el índice de amarillo (YI) de acuerdo a la norma ASTM D1925.

Discos de película, se apoyaron sobre ambas placas de calibración del equipo (fondo blanco y fondo negro), y se eliminaron las posibles burbujas de aire que pudieron haber quedado en la interfase placa-película, presionando suavemente la muestra. Las determinaciones de color fueron realizadas en, al menos, 4 posiciones diferentes de la superficie de las películas por triplicado.

Una vez obtenidos los parámetros CIELab, se calculó el ΔE (Delta E, diferencia de color) para todos los sistemas de películas elaboradas a partir de almidón nativo y acetilado. Las diferencias de color se calcularon mediante la siguiente ecuación,

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$$

Donde L* representa la luminosidad, a* la cromaticidad rojo-verde, y b* la cromaticidad amarillo-azul. Asimismo:

$$\Delta L^* = L^* - L_0^*$$

$$\Delta a^* = a^* - a_0^*$$

$$\Delta b^* = b^* - b_0^*$$

Siendo L_0^*, a_0^* y b_0^* los valores de referencia correspondientes.

Adicionalmente, en el caso de las películas de almidón nativo y acetilado en presencia de HPMC, se midió el índice de blancura (WI) de acuerdo a la norma ASTM E313 y la opacidad, siguiendo la técnica usada por Farroni (2011), en la cual se determinó el valor de L* para el fondo blanco y fondo negro. A partir de esos datos se calculó la opacidad de las muestras, como la relación entre el valor de luminosidad obtenido con fondo negro y con fondo blanco, de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$\text{Opacidad} = \frac{L^* \text{ fondo negro}}{L^* \text{ fondo blanco}}$$

3.5.2. Espesor de las películas

El espesor fue determinado usando un espesímetro digital Modelo ID-C112M (Mitutoyo Corp. Japón), con una precisión de 0,001 mm. Las medidas se realizaron en, al menos, tres sitios diferentes de las películas.

3.5.3. Ensayo mecánico de tracción

Para la realización de este ensayo, se usó una Máquina Universal de Testeo Instron Testing Machine model 3345 (Instron Corp., USA), provista de una celda de carga de 100 N y mordazas neumáticas. El software de comando del equipo y de recolección de datos fue el Blue Hill 2, (Instron Corp., USA). La separación inicial entre las mordazas fue de 20 mm y la velocidad de movimiento vertical de la mordaza superior fue de 50 mm/min (**Figura 3.2**).

Para este ensayo se usaron, como mínimo, 10 especímenes de cada formulación de las películas con geometría de paralelepípedo de altura 60 mm y área (A) de 6 mm x espesor. A partir de los datos crudos arrojados por el equipo Instron (Fuerza en N y desplazamiento en mm), se obtuvieron los datos de esfuerzo (N) y deformación (mm). Para calcular el esfuerzo, definido como la intensidad de las fuerzas con las que un cuerpo resiste un cambio en su forma, por unidad de área de aplicación de dicha fuerza, se usó la ecuación:

$$\sigma = \frac{F}{A}\left[\frac{N}{m^2}\right] = \frac{F}{A}[Pa]$$

Y para obtener la deformación, la cual se define como el cambio por unidad de longitud en una dimensión lineal de un cuerpo; se usó la ecuación:

$$\%\,\varepsilon = \frac{\Delta l\,(mm)}{Lo\,(mm)} \times 100 = \frac{L - Lo}{Lo} \times 100$$

Donde (Δl) corresponde a la variación dimensional y (L_0) es constante y corresponde a un valor de 20 mm. El resultado es expresado en forma porcentual, es decir, multiplicando el resultado por 100.

A partir de las curvas esfuerzo versus deformación, se determinaron los siguientes parámetros para todos los sistemas:

- Esfuerzo a la ruptura (σ_r): Es el máximo esfuerzo que la muestra soporta antes de la ruptura.
- Deformación a la ruptura (ε_r): Es la deformación en el punto de ruptura de la muestra.
- Modulo elástico o módulo de Young (E): Es una medida de la rigidez del material. Da información del comportamiento elástico. Es la pendiente del tramo inicial de la curva.

Figura 3.2. Ensayo de Tracción (muestra de película sostenida por mordazas neumáticas).

3.5.4. Humedad

El contenido de humedad de las películas se determinó mediante el secado de las mismas en estufa de vacío a 100 ºC durante 24 horas. El resultado se expresó como % de humedad en base seca (% b.s.).

3.5.5. Solubilidad en agua

Según Ghasemlou (2011) la solubilidad en agua se define como la proporción de materia seca de película soluble en agua, después de su inmersión en agua destilada. Para este ensayo, se determinó el porcentaje inicial de materia seca, mediante el secado de discos de 2 cm de diámetro en una estufa de vacío a 100 ºC durante 24 horas. En paralelo, otros discos de igual diámetro fueron pesados y sumergidos en 50 ml de agua destilada durante 24 horas a 25ºC. La masa aproximada de cada disco de película fue 0,05 gramos. Posteriormente a la inmersión, las películas fueron retiradas por filtración y secadas a 100 ºC en estufa de vacío, durante 24 horas, a fin de determinar la masa seca no solubilizada. La solubilidad en agua se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Solubilidad (\%)} = \left(\frac{\text{masa seca inicial} - \text{masa seca final}}{\text{masa seca inicial}}\right) \text{x } 100$$

3.5.6. Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

La permeabilidad al vapor de agua de las películas fue determinada gravimétricamente, a 25ºC, adaptando el procedimiento recomendado por la norma ASTM E96-00 (2000).

Para realizar el ensayo de permeabilidad se utilizaron celdas de acrílico de dimensiones: 4,4 cm de diámetro interno, 8,4 cm de diámetro externo y 3,5 cm de profundidad (**Figura 3.3**). Las celdas se cargaron con $CaCl_2$ (Anedra, México) y se colocó la película entre la pieza superior de la celda y la tapa, dejando 10 mm de altura libres en la parte superior, de modo tal que hubiera cámara de aire entre el desecante y la película. Se ajustó la tapa al cuerpo de la misma con cuatro tornillos equidistantes.

Es de destacar que se aplicó grasa de vacío sobre las planchas de goma que están adheridas entre la boca y tapa de las celdas para asegurar el cierre correcto.

En el interior de la celda la H.R. era de ~0% (presión parcial de vapor de agua ≅ 0 Pa) por efecto de la presencia de $CaCl_2$. El área expuesta de película fue de 15,205 cm^2.

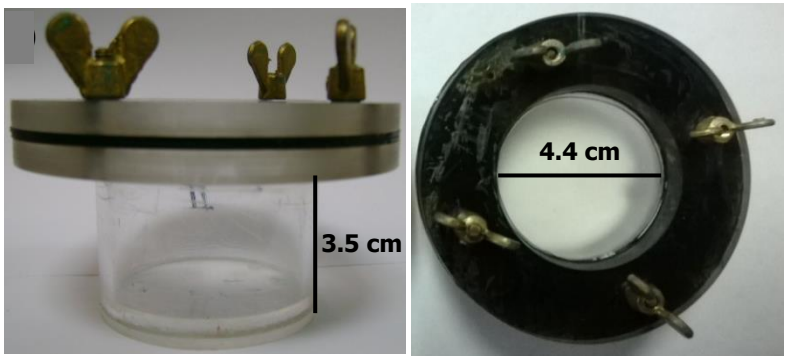

Figura 3.3. Celda de acrílico utilizadas en la determinación de la PVA. Izquierda). Vista Frontal y Derecha). Vista Superior.

Una vez preparadas, las celdas se ubicaron en una cámara de humedad y temperatura controlada (Ibertest, España) a 25ºC y humedad relativa de 70% (presión parcial de vapor de agua ~2288 Pa). Luego de, aproximadamente, 12 horas, se alcanzó el régimen estacionario de transmisión de vapor de agua y se comenzaron a registrar los incrementos de peso de las celdas durante tres días. Utilizando un ajuste por regresión lineal de los datos de variación de peso en función del tiempo, se calculó la velocidad de trasmisión de vapor de agua (VTVA) según la siguiente ecuación:

$$VTVA = \frac{G}{t \times A}$$

Donde:

VTVA es la velocidad de trasmisión de vapor de agua por unidad de área (g $s^{-1}m^{-2}$)

G / t es la pendiente de la recta obtenida (cambio de peso en g s^{-1})

A es el área expuesta de transferencia (m^2)

Luego, se calculó la permeabilidad al vapor de agua de acuerdo con la ecuación:

$$PVA = \left(\frac{VTVA \, x L}{\Delta P} \right)$$

Donde:

L es el espesor de la película (m)

ΔP es la diferencia de presión de vapor de agua a través de la película (Pa).

3.5.7. Análisis de la microestructura

3.5.7.1. Microscopía óptica

Se utilizó un microscopio Zeiss Axioskop 2Plus (Zeiss, Obekochen, Alemania). Las películas fueron apoyadas sobre un portaobjetos, cortadas en tiras con bisturí, humectadas con agua, cubiertas con un cubreobjetos y observadas con un aumento de 400 X.

3.5.7.2. Microscopia electrónica de barrido ambiental (ESEM)

Las películas fueron observadas sin tratamiento previo. Se obtuvieron micrografías de la superficie de las películas, así como también de la superficie del área de fractura de las mismas, utilizando un microscopio electrónico de barrido ambiental XL 30 ESEM (Philips, Holanda).

Para observar la superficie de fractura se procedió a congelar las películas con nitrógeno líquido y se fracturaron las mismas aplicando presión con una cuchilla.

3.5.8. Ángulo de contacto

Las medidas del ángulo de contacto fueron realizadas en un Tensiómetro (Sinterface Technologies, Alemania) (**Figura 3.4.)** equipado con una cámara CCD. Un software analizador de imagen (PAT-1, Sinterface Technologies, Alemania) fue usado

para medir el ángulo formado entre la superficie de la película y la tangente de la gota de líquido en el punto de contacto con la superficie de la película.

El ángulo de contacto de las películas fue determinado siguiendo el método de la gota sésil (Ollé y col., 2014b). Para ello, se depositó una gota de agua ultrapura de 3 µl con una jeringa automática, sobre la superficie de la película apoyada en un soporte adecuado. El tiempo de cada medida fue de 20 segundos para cada gota. En total se evaluaron, al menos, 12 muestras por cada formulación, sobre la cara de la película que permaneció en contacto con el aire al momento del secado.

Figura 3.4. Tensiómetro usado para la medición del ángulo de gota.

3.5.9. Espectroscopia FTIR

Mediante un espectrómetro (Perking Elmer, Inc.) se obtuvieron los espectros IR de las películas utilizando la técnica de ATR (Attenuated Total Reflection, sobre cristal de ZnSe), con una resolución de 4 cm^{-1} y aplicando transformada de Fourier. Se obtuvieron espectros entre 650 y 4000 cm^{-1} y se determinaron las bandas de absorción características.

3.5.10. Análisis mecánico dinámico (DMA)

Las temperaturas e intensidades de los fenómenos de relajación en las películas fueron determinadas por análisis mecánico dinámico (DMA). Las determinaciones se realizaron en un equipo DMA modelo Q800 (TA Instruments, New Castle, USA), con un sistema de enfriamiento con nitrógeno líquido y en modo tensión, sujetando la muestra mediante el uso de mordazas. Se caracterizaron probetas de geometría rectangular (6 mm x 30 mm).

Se llevaron a cabo barridos de temperatura entre -100°C y 150°C a una velocidad de 3°C/min, a una frecuencia de 10 Hz y a una amplitud fija de 10 µm.

Se obtuvieron las curvas del módulo de almacenamiento *(E')*, módulo de pérdida *(E")* y de tan delta (tan δ) en función de la temperatura, las cuales se analizaron usando el software Universal Analysis 2000 V4.2E 2005 para Windows (TA Instruments Waters, USA). El módulo *E'* está relacionado con la energía mecánica almacenada por ciclo cuando la muestra está sometida a deformación y expresa la respuesta elástica del material. El módulo *E"* expresa la respuesta viscosa la cual está relacionada con la energía disipada como calor por ciclo, cuando la muestra es deformada. El factor de pérdida es definido como la tan $\delta = E'' / E'$, siendo δ el ángulo de desfasaje entre el estímulo y la respuesta. Las temperaturas de los procesos de relajación asociados a transiciones vítreas *(Tg)* fueron determinadas a través del punto de inflexión de la curva del módulo de almacenamiento *(E')*, así como de los máximos en la curva de tan δ (López y col., 2011).

3.6. Evaluación de la funcionalidad antimicrobiana de las películas comestibles

3.6.1. Medios de cultivo y cepas

Los microorganismos utilizados en este estudio fueron: *Zygosaccharomyces bailii* (NRRL 7256)*, Pseudomonas fluorescens* (ATCC 49838) y *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). Para el crecimiento de *Z. bailii* se usó caldo Sabouraud (Biokar, Francia), para *P. fluorescens* se usó caldo Mueller-Hinton (Biokar, Francia) y para *L. plantarum* se usó caldo MRS (Biokar, Francia). Para el recuento en placa se usaron los ágares

correspondientes, incubando 5 días a 25 ºC en el caso de la levadura y 72 h a 37 ºC en el caso de las bacterias.

3.6.2. Preparación de los inóculos

Para la preparación de los inóculos se tomó una alícuota a partir de una estría stock del microorganismo de referencia, utilizando un ansa rulo en condiciones de esterilidad. Se traspasaron dos ansadas a un tubo con 10 ml del caldo correspondiente. Este pre-cultivo fue incubado 24 h en cámara a 25°C para la levadura y 18-20 h a 37°C para las bacterias.

3.6.3. Ensayo de difusión en ágar

Para la realización del ensayo de difusión en ágar o del halo, se plaquearon 15 ml de cada uno de los ágares necesarios para el crecimiento de los microorganismos testeados. Sobre cada placa conteniendo el ágar, se colocó 1ml del inóculo correspondiente, se retiró el excedente (con micropipeta y tip estéril) y se dejó secar bajo cámara de flujo laminar durante 20 minutos. Posteriormente, tres (3) discos de 10 mm de diámetro de cada uno de los sistemas estudiados se pusieron en contacto con el ágar inoculado en forma estéril y se almacenaron 48 h a 7ºC. Luego se incubaron 24 h más a 25ºC, para la levadura o a 37ºC, para las bacterias.

La acción antimicrobiana de las películas se determinó observando la existencia de zonas claras en la zona de contacto, así como alrededor de los discos, las cuales expresaban la inhibición ejercida.

3.6.4. Ensayo de barrera

Con el objeto de estudiar la efectividad de las películas como barrera antimicrobiana para proteger un producto de alta actividad de agua (a_w), se formuló un alimento modelo de a_W y pH controlado, a partir de los ágares correspondientes a cada microorganismo, con a_w reducida (a_w ~0,98) mediante la adición de dextrosa (Anedra,

Argentina) y pH ajustado a 4,5 con la ayuda de una solución de ácido cítrico estéril (Anedra, Argentina) al 50 % (p/p).

Discos de 1 cm de diámetro de las películas estudiadas conteniendo KS o KS/carvacrol y películas sin antimicrobianos (sistema control), fueron cortados en forma aséptica, pesados y aplicados en la superficie de las placas conteniendo los ágares adecuados para cada microorganismo a testear, con a_w y pH reducidos. A continuación, 10 µl de un inóculo de *L. plantarum* (10^6 UFC/ml) o de *Z. bailii* (10^5UFC/ml) o de *P. fluorescens* (10^6 UFC/ml) fueron sembrados sobre los discos de película. Los sistemas fueron incubados a 25 ºC por 2 días. A tiempos seleccionados (0, 2, 24 y 48 horas), dos discos fueron muestreados y suspendidos, cada uno, en 1 ml de agua peptona estéril (Biokar, Francia) contenida en un tubo de vidrio. Los microorganismos fueron re- suspendidos mediante agitación durante 2 minutos a 2500 RPM con un vórtex (Ika Works Inc., USA). A continuación, se prepararon diluciones seriadas en agua peptona para el recuento de células, siendo expresado el mismo como unidades formadoras de colonias por gramo de película (UFC/g). Las bacterias fueron enumeradas llevando a cabo el sembrado en profundidad en los ágares correspondientes, seguido de incubación a 37ºC durante 48-72 horas. La enumeración de la población de levadura fue realizada por la técnica de plaqueo en superficie de ágar Sabouraud e incubando a 25ºC durante 5 días, antes de recuento. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

3.7. Análisis estadístico

Todos los ensayos fueron realizados, al menos, por triplicado salvo indicación de lo contrario. Los resultados son informados en base a su promedio y desvío estándar.

Para el estudio de las propiedades físicoquímicas de las películas, se analizó el efecto de dos factores: plastificante (glicerol) e hidroxipropil metilcelulosa. Se ensayaron dos niveles de glicerol (0,85% y 1,67% p/p) y tres niveles de HPMC (0%, 0,67% y 1,34% p/p) con mediciones repetidas para ambos factores. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores con un nivel de significación (α) de 0,05 y aplicando un test a posteriori (LSD) a fin de evaluar los efectos de los factores y las posibles interacciones entre ellos. Para analizar las diferencias significativas entre el

uso de almidón nativo y almidón acetilado, se aplicaron un ANOVA de un factor con un nivel de significación de (α) de 0,05 y un test a posteriori (LSD).

El software Statgraphics Centurion XV para Windows, versión 15.2.06, 1982-2007. (Manugistics, Inc., U.S.A) fue utilizado para el tratamiento y análisis de los datos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Obtención y caracterización del almidón acetilado

En el presente trabajo se sintetizó almidón de mandioca acetilado usando calentamiento en microondas de acuerdo al método propuesto por Biswas y col. (2008). En el mismo, la reacción es acelerada debido, principalmente, a las altas temperaturas alcanzadas en el interior de un reactor resistente a altas presiones conteniendo el catalizador iodo. Gracias a la rapidez en lograr los perfiles de temperaturas deseados respecto de aquellos alcanzados cuando se usa un baño de calentamiento convencional, la técnica de microondas es especialmente atractiva en la síntesis de biomateriales (Sosnik y col., 2011).

Durante el proceso de obtención, se registró el perfil de potencia aplicado y temperatura de la muestra en función del tiempo de tratamiento. A modo de ejemplo, en la **Figura 4.1** se muestra el perfil típico de calentamiento dentro del reactor del microondas, así como la evolución de la potencia.

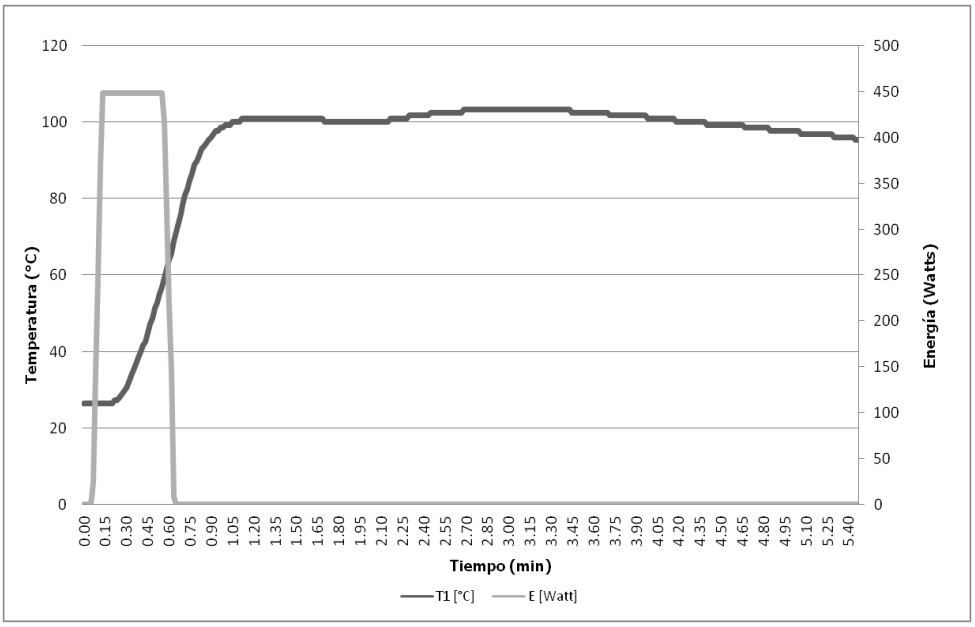

Figura 4.1 Perfil típico de calentamiento dentro del reactor del microondas: Temperatura de la muestra (ºC) y potencia suministrada (Watts) en función del tiempo de tratamiento.

El procedimiento de modificación del almidón de mandioca nativo, mediante acetilación con anhídrido acético, iodo como catalizador y uso de microondas, permitió obtener un polvo de color blanco, similar en su aspecto al almidón de mandioca nativo. Dicho producto presentó un grado de sustitución promedio de 0,19 ± 0,03, el cual corresponde a un porcentaje de grupos acetilos de (4,9 ± 0,8)%. Los almidones acetilados con bajos grados de sustitución (<0,10) se utilizan comúnmente en la industria alimentaria para conferir consistencia, textura y estabilidad (CAA). Recientemente, acetatos de almidón de diferentes grados de sustitución fueron aplicados en el desarrollo de materiales biodegradables para el embalaje de alimentos o aplicaciones farmacéuticas y, especialmente, como material de soporte para liberación controlada de agentes activos (Bello Pérez y col., 2010, Han y col., 2012, Nutan y col., 2005). Debido a las múltiples funcionalidades que presentan los nuevos almidones modificados, los límites de sustitución se encuentran en constante discusión y cambio (Singh y col., 2007).

En la **Figura 4.2** se muestra el espectro FTIR del almidón acetilado en comparación con el nativo y las correspondientes bandas de absorción. Pueden apreciarse bandas características para homopolímeros de glucosa. A 931 y 1149 cm^{-1} las bandas observadas se asocian al estiramiento del enlace C-O; los picos a 1016 y 1078 cm^{-1} son característicos de estiramiento C-O en el anillo de anhidro glucosa y el pico a 1645 cm^{-1} corresponde al estiramiento O-H del agua fuertemente comprometida con la estructura del almidón. Otra banda típica es la de 2929 cm^{-1}, que se asocia al estiramiento C-H de los átomos de H metínicos en el anillo de glucosa. Por último, aparece una amplia banda entre 3100 y 3600 cm^{-1}, con un mínimo en 3330 cm^{-1}, la cual se asocia al estiramiento de los grupos O-H ya sea en forma libre, o bien vinculados a través de enlace puente de hidrógeno intra e intermolecular.

En el caso del almidón acetilado, aparecen dos nuevas bandas. La primera se observa a 1740 cm^{-1}, indicando que algunos grupos hidroxilo del almidón, fueron reemplazados por los grupos acetilo y la segunda, a 1250 cm^{-1}, asociada al estiramiento del C-O del grupo acetilo. A su vez, se observó una marcada reducción en la intensidad de la banda a 1645 cm^{-1} posiblemente debido a una reducción del número de moléculas de agua vinculadas, por la incorporación de grupos acetilo en reemplazo de grupos O-H.

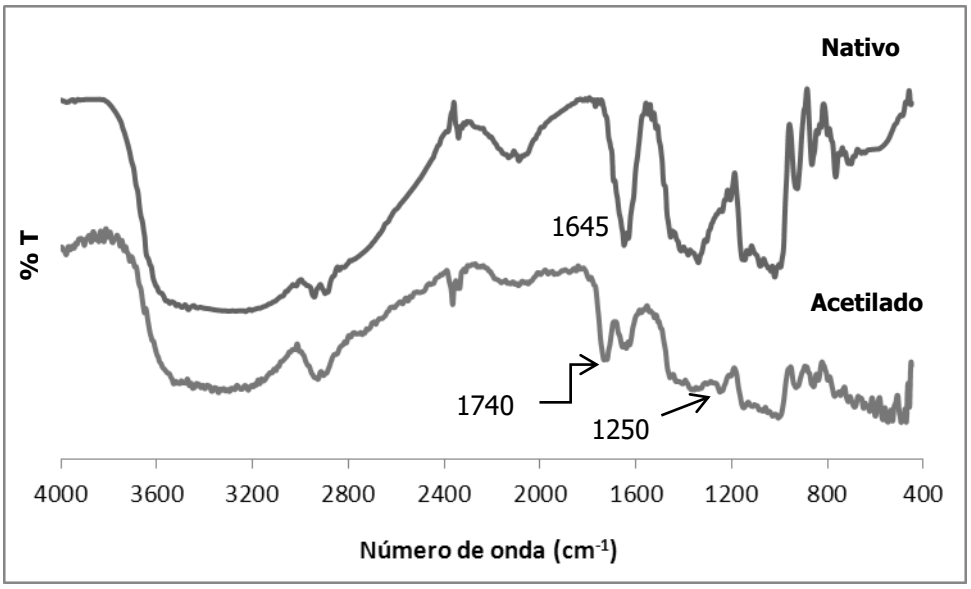

Figura 4.2. Espectro FTIR de almidones nativo y acetilado.

En cuanto al tamaño de partícula, la **Figura 4.3** muestra los perfiles de distribución de tamaño para el almidón nativo y acetilado obtenidos por dispersión estática de luz.

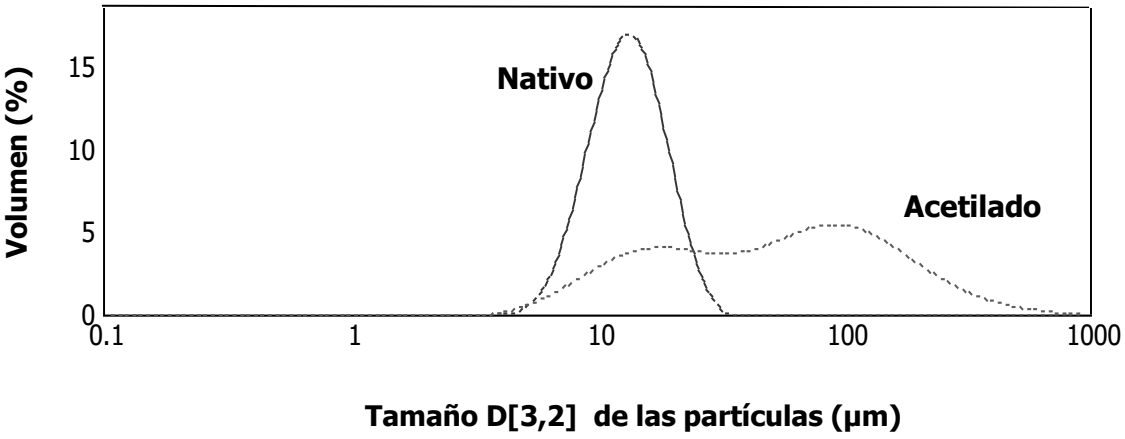

Figura 4.3. Distribución del tamaño de partícula para el almidón nativo y acetilado.

Puede observarse que el almidón nativo presentó una distribución de tamaño monomodal, con una mayor proporción de partículas en el rango de 13 – 17 μm, mientras que el acetilado dio lugar a una distribución del tipo bimodal, presentando grupos mayoritarios entre 16 - 22 μm y 85 – 120 μm. En este último caso, también se observó una mayor dispersión de los tamaños de partículas en la muestra (bandas más anchas).

En la **Tabla 4.1** se resumen los parámetros obtenidos a partir de la distribución de tamaños, así como la solubilidad y capacidad de retención de agua de los almidones estudiados.

Tabla 4.1. Caracterización del almidón de mandioca nativo y acetilado.

Almidón	**Distribución del tamaño de partícula**[1]				**Solubilidad y retención de agua (85 ºC)**	
	d(0.1) (μm)	**d(0.5)** (μm)	**d(0.9)** (μm)	**D[3,2]** (μm)	**S** (%)	**Retención de agua** (%)
Nativo	8,411 ± 0,004	13,287 ± 0,006	20,534 ± 0,01	12,439 ± 0,006	1,1 ± 0,8	324 ± 36
Acetilado	11,54 ± 0,06	55 ± 1	199 ± 9	29,2 ± 0,3	8,8 ± 0,8	630 ± 58

[1]D (3,2) Diámetro se Sauter: es el diámetro de la superficie media ponderada, asumiendo partículas esféricas de la misma área superficial que las partículas reales. d (0.1), d(0.5) y d(0.9): valores de tamaño de partícula indicando que, respectivamente, el 10%, 50% y 90% de la distribución se encuentra por debajo de este valor.

De acuerdo con estos resultados, se puede inferir que el procedimiento de acetilación produjo partículas con un diámetro mayor que las partículas de almidón nativo ($p<0.05$) tomando como parámetro el diámetro de Sauter. A su vez, se puede observar que el 10, 50 y 90% de las partículas acetiladas presentaron mayor diámetro que las partículas de almidón sin acetilar. Este aumento en el tamaño puede deberse, por un lado, a la introducción de los grupos acetilo a la cadena de almidón (Prieto-Mendez y col., 2010) y, por otro lado, a la formación de agregados durante el proceso de obtención del almidón modificado. Zamudio-Flores y Bello Pérez (2013) reportaron que gránulos de almidón de avena acetilados resultaron con mayor tamaño de partícula respecto de los nativos, atribuyendo esta tendencia a que el proceso de modificación induce cambios en la superficie de los gránulos, por la salida de cadenas de amilosa que propicia la unión entre ellos. Por otro lado, Sánchez-Rivera y col. (2010), informaron que la adición de anhídrido acético junto con iodo en el medio de

reacción dio como resultado la agregación de gránulos de almidón de maíz y que la misma aumentó con el incremento de los niveles de iodo usado como catalizador. Este hecho podría atribuirse a la exposición de grupos hidrofílicos superficiales que aumentaron las uniones tipo puente de hidrógeno entre los gránulos, dando lugar a la coalescencia o unión. Resultados similares fueron también reportados por Singh y col. (2004) para almidones de maíz y papa tratados con anhídrido acético.

El almidón acetilado incrementó significativamente ($p<0,05$) su capacidad de retención de agua y solubilidad a 25ºC, respecto del almidón nativo (**Tabla 4.1**). Un comportamiento similar fue reportado por Bello Pérez y col. (2000) para almidón de trigo acetilado con DS 0,04. Estos autores indicaron que la introducción de grupos ésteres acetato aumentó la capacidad de retención de agua debido a su habilidad para formar enlaces del tipo puente de hidrógeno. A su vez, Mirmoghtadaie y col. (2009) atribuyeron a la introducción de grupos acetilo, el mayor grado de hinchamiento del almidón de avena acetilado (DS: 0,05) en comparación con el nativo. Dichos grupos podrían facilitar el acceso de agua a las zonas amorfas, debido a una desorganización estructural intragranular causada por efectos estéricos y a la interrupción de enlaces de hidrógeno en los gránulos de almidón. Posiblemente, el tratamiento con alta temperatura, en presencia de catalizador y en medio de anhídrido acético provocó una erosión superficial y roturas del gránulo que, conjuntamente con la introducción de grupos ésteres, favorecieron la interacción de zonas amorfas con el agua.

La **Figura 4.4** muestra las micrografías de los gránulos de almidón nativo y acetilado. Puede apreciarse agrupamientos y gránulos con la superficie dañada o erosionada, en el caso del almidón modificado, pero sin afectar sustancialmente la morfología del gránulo (semiesferas y esferas truncadas).

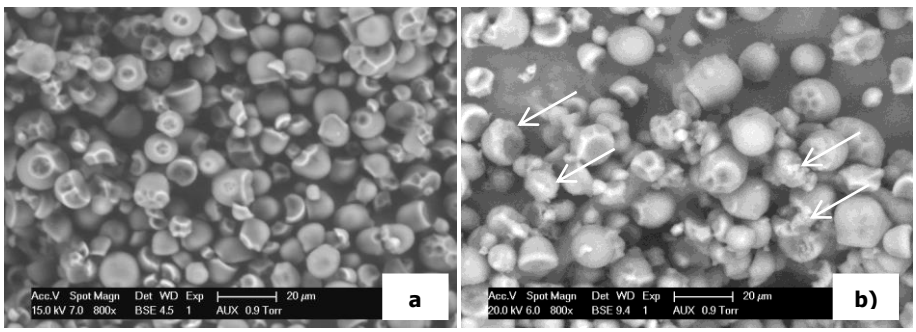

Figura 4.4 Imágenes SEM de los almidones nativo (a) y acetilado (b). Magnificación: 800X.

Las propiedades térmicas (gelatinización) del almidón nativo y modificado fueron analizadas por DSC. Los resultados se muestran en la **Figura 4.5** y se resumen en la **Tabla 4.2**. La gelatinización del almidón es un proceso que implica la alteración de la estructura de dobles hélices y la fusión de las estructuras cristalinas. Se observó que la muestra acetilada tuvo una temperatura media de gelatinización (T_m) significativamente más baja ($p<0,05$) que su contraparte nativa.

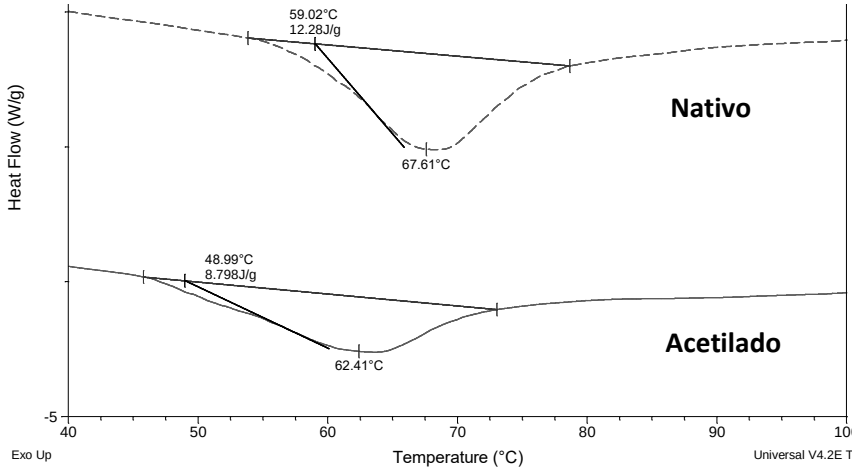

Figura 4.5 Curvas de DSC para el almidón nativo y acetilado.

Por otro lado, la entalpía de gelatinización presentó una tendencia a disminuir luego del tratamiento de esterificación. Se ha propuesto que la temperatura de gelatinización del almidón depende, en parte, de la estructura molecular de la amilopectina (perfección y ordenamiento de cristales, longitud de la cadena, grado de ramificación, masa molar, etc.), así como de la estructura de gránulo (relación de zonas amorfas y cristalinas). A su vez, el valor de entalpía de gelatinización depende de la organización de las dobles hélices, así como de la cristalinidad (Han y col., 2013).

Tabla 4.2 Propiedades térmicas del almidón nativo y acetilado.

Sistema	T_{Onset} (ºC)	T_m (ºC)	Entalpía de gelatinización (J/g almidón b.s.)
Nativo	59,02 ± 0,1	67,61 ± 0,3	10,6 ± 0,7[a]
Acetilado	48,99 ± 2	62,41 ± 0,3	8,2 ± 0,9[a]

T_{Onset}: temperatura onset, T_m: temperatura de gelatinización (definida como la temperatura a la cual ocurre la fusión de las estructuras cristalinas). Igual letra en la misma columna, indica ausencia de diferencias significativas (p>0,05).

Los cambios en la temperatura y la entalpía de gelatinización corroboraron que la acetilación del almidón produjo desorganización parcial (Bello Pérez y col., 2010). Esta desorganización está relacionada con el debilitamiento de los gránulos de almidón lo cual conduce a una ruptura temprana de la doble hélice del almidón, alcanzando valores más bajos de T_{onset} y T_m. Luego de la modificación del almidón habría menos cristales en los gránulos debido a que una parte de ellos fueron dañados durante la acetilación y, por lo tanto, la gelatinización se produce a una temperatura inferior.

La disminución del grado de cristalinidad observada en el caso del almidón acetilado fue confirmada por difracción de rayos x (**Figura 4.6**). En los difractogramas se aprecia una disminución en la altura de los picos del espectro y en la agudeza de los mismos. Resultados similares fueron reportados por varios autores para almidones modificados de diferente fuente botánica (Bartz y col., 2015; Colussi y col., 2014; El Halal y col., 2015; Han y col., 2013; Han y col., 2012; López y col., 2008).

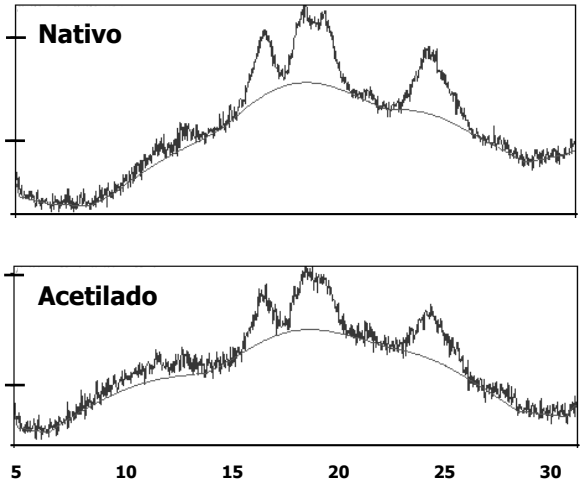

Figura 4.6 Espectro de rayos X del almidón nativo y acetilado.

Estos resultados revelan que el almidón modificado químicamente presentó propiedades distintivas respecto del nativo: gránulos erosionados y aglomeración, mayor retención de agua y solubilidad, menor cristalinidad y temperatura de gelatinización más baja. En una segunda etapa del trabajo, se analizó si estas características afectaban o no, las propiedades de las películas portadoras de antimicrobianos, en comparación con aquéllas desarrolladas con el uso de almidón nativo.

4.2. Caracterización fisicoquímica de películas comestibles elaboradas con almidón nativo/HPMC o acetilado/HPMC y conteniendo sorbato de potasio

4.2.1. Características visuales de las películas

En esta etapa de la tesis, se elaboraron películas comestibles a base de almidón nativo o acetilado, conteniendo o no HPMC y portadoras de sorbato de potasio. En la **Figura 4.7** puede observarse una imagen de algunas películas seleccionadas.

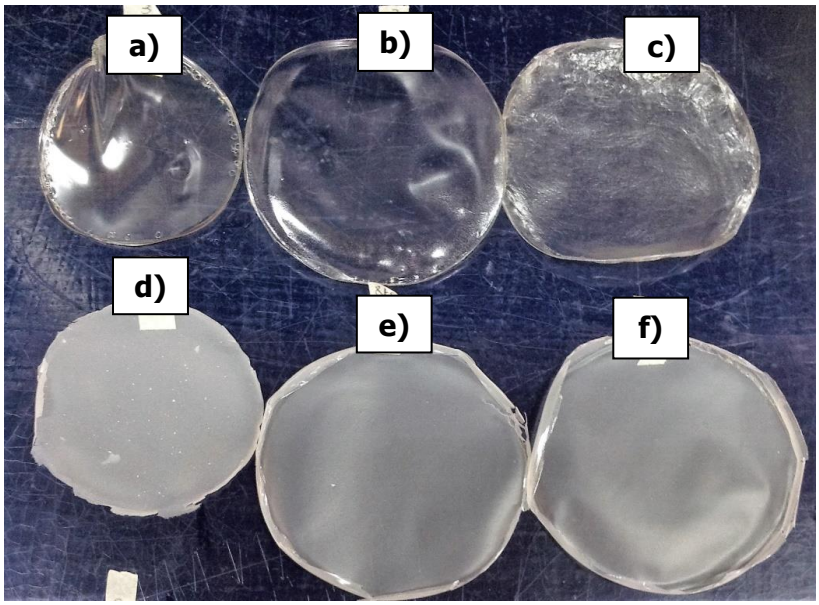

Figura 4.7. Imágenes de las películas obtenidas a partir de: a) almidón nativo (AN), b) HPMC, c) AN y 0,67% (p/p) HPMC, d) almidón acetilado (AA), e) AA y 0,67% (p/p) HPMC, f) AA y 1,34% (p/p) HPMC. Todas las formulaciones contienen sorbato de potasio 0,3% (p/p) y glicerol 0,85% (p/p).

Como se puede observar, tanto las películas fabricadas con almidón nativo (**Figura 4.7a**) o con HPMC (**Figura 4.7b**) como únicos biopolímeros, resultaron transparentes mientras que la película obtenida a partir de la mezcla de ambos biopolímeros (**Figura 4.7c**), resultó levemente más opaca. Por otro lado, las películas elaboradas con almidón acetilado presentaron un tono blanquecino y menor transparencia (**Figura 4.7d-f**). En la película elaborada con almidón acetilado solamente **Figura 4.7d**), se aprecian partículas las cuales serían agregados de gránulos de almidón modificado, dispersos en una matriz continua. En cambio, las películas conteniendo la mezcla de almidón acetilado y HPMC (**Figura 4.7 e y f**) resultaron más homogéneas.

4.2.2. Parámetros de color de las películas

4.2.2.1. Películas elaboradas con almidón nativo – Efecto del contenido de glicerol y HPMC

Los parámetros de color de las películas elaboradas con almidón nativo se muestran en la **Figura 4.8**.

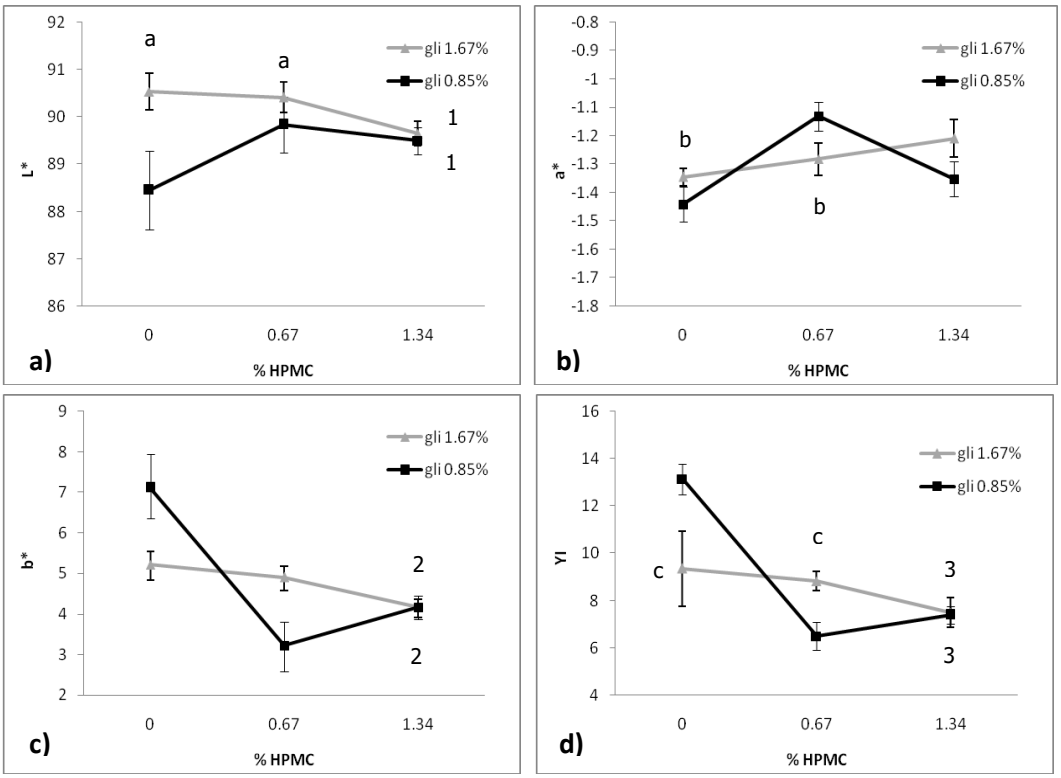

Figura 4.8. Parámetros de color de películas elaboradas con almidón nativo y KS 0,3% (p/p) y su variación con el contenido de HPMC. Panel a) L*; panel b) a*; panel c) b* y panel d) YI (Índice de Amarillo). Se informa el valor medio ± desvío estándar. Efecto del contenido de glicerol: Valores con el mismo número no difieren significativamente (p>0,05). Efecto del contenido de HPMC: Valores con la misma letra no difieren significativamente (p>0,05).

De acuerdo a los resultados, en ausencia de HPMC, cuando el contenido de glicerol fue más alto, el valor de L* se incrementó respecto a las películas con menor nivel de plastificante (sistemas S1 y S4). Una tendencia similar fue observada para los sistemas de películas con menor contenido de HPMC (S2 y S5). Cuando el nivel de glicerol fue más bajo (sistemas S4 a S6), el agregado de HPMC incrementó el valor de L*, mientras que para el nivel más alto de plastificante (sistemas S1 a S3), sólo se

observó un cambio leve, no significativo ($p<0,5$) debido al agregado de HPMC. A la mayor concentración de HPMC, no se observaron diferencias ($p>0,05$) para este parámetro independientemente del nivel de plastificante usado (**Figura 4.8a**).

En cuanto al parámetro a*, se determinó que el contenido de glicerol ejerció un efecto leve pero significativo ($p<0,05$) en este parámetro. Por otro lado, el valor de a* tendió, en general, a aumentar (menos negativo), a medida que aumentaba el nivel de HPMC y para ambos niveles de glicerol (**Figura 4.8b**). Chillo y col. (2008) estudiaron el color desarrollado por películas elaboradas a base de quitosano con diferentes cantidades de glicerol y observaron que cuando aumentaba el contenido de dicho plastificante, incrementaban los valores de los parámetros a y L de Hunter Lab.

En la **Figura 4.8c y d**, puede observarse que los parámetros b* y YI presentaron un patrón de comportamiento similar: en ausencia de HPMC se registraron los valores más altos de b* y YI para ambos niveles de plastificante (sistemas S1 y S3), siendo ambos parámetros de color significativamente ($p<0,05$) mayores para el nivel de glicerol más bajo. En presencia de HPMC, y a medida que se incrementaba su contenido, b* y YI disminuyeron significativamente, llegando a tomar valores similares independientemente del contenido de glicerol, para el mayor nivel de HPMC (sistemas S3 y S6). Espinel y col. (2014) analizaron el efecto de la formulación de películas comestibles a base de almidón de mandioca y HPMC, plastificadas con glicerol y determinaron que un aumento en el contenido de HPMC determinaba la obtención de una matriz biopolimérica con menor YI.

4.2.2.2. Películas elaboradas con almidón acetilado – Efecto del contenido de glicerol y HPMC

En la **Figura 4.9** se observan los resultados de los parámetros de color para las películas elaboradas con almidón acetilado.

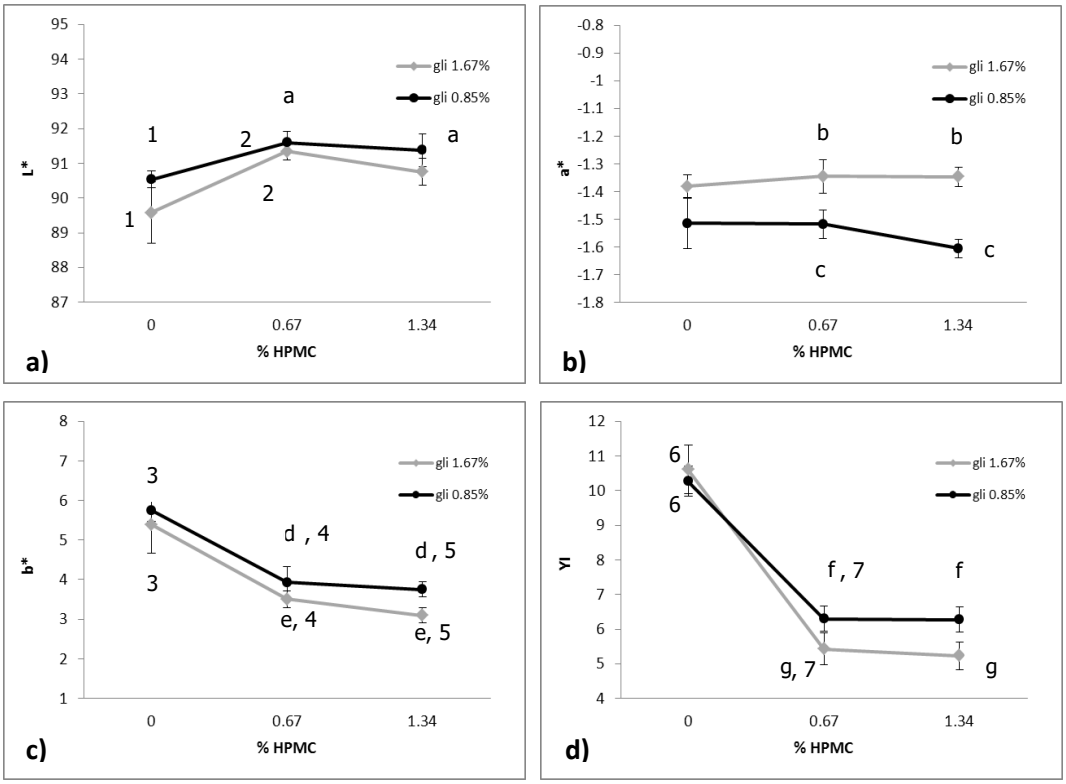

Figura 4.9. Parámetros de color de películas elaboradas con almidón acetilado y KS 0,3% (p/p): Panel a) L*; panel b) a*; panel c) b* y panel d) YI (Índice de Amarillo). Se informa el valor medio ± desvío estándar. Efecto del contenido de glicerol: Valores con el mismo número no difieren significativamente (p>0,05). Efecto del contenido de HPMC: Valores con la misma letra no difieren significativamente (p>0,05).

En cuanto a L* (**Figura 4.9a)** se observó que, a menor nivel de plastificante, este parámetro tomó valores mayores. Además, pudo determinarse que el contenido de glicerol sólo afectó significativamente (p<0,05) a este parámetro para la mayor concentración de HPMC. La incorporación de HPMC, en general, incrementó significativamente el valor de L*.

El parámetro a* fue afectado en forma significativa sólo por el nivel de glicerol, siendo dicho parámetro más grande (menos negativo) en el caso de las formulaciones con mayor contenido de plastificante (**Figura 4.9b**).

Los parámetros b* y YI (**Figura 4.9c y d**) sufrieron una disminución, al aumentar el nivel del glicerol. A su vez, se observó una reducción significativa en presencia de HPMC para el parámetro b* pero dicha reducción no se vio influenciada (p>0,05) por la cantidad de HPMC incorporada a la formulación.

Estos resultados indican que el color de las películas elaboradas tanto con almidón nativo como con almidón acetilado se vio fundamentalmente afectado por el agregado de HPMC, hidrocoloide que produjo, en general, un aumento del L* y menores valores de b* y YI. Basch y col. (2013) concluyeron que la adición de HPMC a películas de almidón de mandioca conteniendo sorbato de potasio y/o nisina, producía matrices más claras.

Cabe señalar que el análisis de la varianza de dos factores (glicerol y HPMC), reveló la existencia de interacciones significativas ($p<0,05$) entre las variables estudiadas para los parámetros de color (L*, a*, b* e YI) de las películas basadas en almidón nativo y sólo para L*, en el caso de las películas de almidón acetilado (VER ANEXO I).

El cambio de color de las películas se analizó mediante el parámetro Delta E (ΔE) de acuerdo con Famá y col. (2007). Los resultados pueden observarse en las **Tablas 4.3 a 4.4**.

Para obtener los valores de ΔE en relación con el aumento de glicerol, en el presente trabajo, se usó como valor de referencia el valor de los parámetros correspondientes a 0,85% (p/p) de glicerol para cada nivel de HPMC. Para obtener los valores de ΔE relacionados al aumento de HPMC se utilizó para cada nivel de glicerol, el sistema con 0% (p/p) HPMC, cuando se quiso comparar cada sistema de películas por separado (nativo o acetilado) (**Tablas 4.3 y 4.4**). Por otro lado, cuando se realizó la comparación entre sistemas de películas nativas vs acetiladas, los parámetros de referencia que se usaron fueron los correspondientes a los de las películas fabricadas con almidón nativo; la comparación se realizó para un mismo nivel de glicerol y también, para un mismo contenido de HPMC.

Los resultados mostraron de modo general que, cuando se usó almidón nativo, la diferencia de color de las películas tendió a ser mayor con el agregado de HPMC para ambos niveles de glicerol (ΔE ~3). A su vez, el nivel de plastificante a un mismo nivel de HPMC, generó valores de ΔE más bajos si la HPMC estaba presente (ΔE ~0,5) (**Tabla 4.3)**. Por otro lado, con el uso de almidón acetilado, los valores de ΔE debido al agregado de HPMC, fueron menores para el nivel de plastificante más bajo (ΔE ~2) sin encontrar diferencias para ambos niveles de HPMC. Se observó que ΔE por al aumento del plastificante se redujo cuando estaba presente la HPMC (ΔE ~1) (**Tabla 4.4)**.

Tabla 4.3. Valores de ΔE para sistemas de películas elaborados a partir de almidón nativo de mandioca.

Parámetros		**HPMC (% p/p)**			**ΔE**	
		0	**0,67**	**1,34**	**0,67 %**	**1,34 %**
0,85 % Glicerol	**L***	87.599	90.541	90.533	**3 ± 1[a]**	**3,3 ± 0,9[a]**
	a*	-1.298	-1.323	-1.307		
	b*	4.393	3.311	2.817		
1,67 % Glicerol	**L***	87.391	90.26	90.78	**3 ± 1[b]**	**3,6 ± 0,9[b]**
	a*	-1.130	-1.22	-1.35		
	b*	5.180	4.03	3.08		
ΔE		**0,7 ± 0,2[1]**	**0,5 ± 0,3[1,2]**	**0,4 ± 0,2[2]**		

Se informa el valor medio ± desvío estándar. Efecto del contenido de glicerol: Valores con el mismo número no difieren significativamente (p>0,05). Efecto del contenido de HPMC: Valores con la misma letra no difieren significativamente (p>0,05).

Tabla 4.4. Valores de ΔE para sistemas de películas elaborados a partir de almidón acetilado de mandioca.

Parámetros		Nivel de HPMC (% p/p)			ΔE	
		0%	0,67%	1,34 %	0,67%	1,34%
0,85 % Glicerol	L*	90.533	91.600	91.375	2,1 ± 0,6[a]	2,1 ± 0,8[a]
	a*	-1.515	-1.518	-1.606		
	b*	5.753	3.935	3.754		
1,67 % Glicerol	L*	89.577	91.345	90.755	4 ± 2[b]	4 ± 1[b]
	a*	-1.382	-1.345	-1.347		
	b*	5.395	3.507	3.099		
ΔE		3,5 ± 0,8	0,9 ± 0,5[1]	1,3 ± 0,5[1]		

Se informa el valor medio ± desvío estándar. Efecto del contenido de glicerol: Valores con el mismo número no difieren significativamente (p>0,05). Efecto del contenido de HPMC: Valores con la misma letra no difieren significativamente (p>0,05).

Cuando se realizó la comparación de los valores de ΔE entre películas constituidas por almidón nativo y acetilado, se observó que, de manera general, el ΔE fue mayor para los sistemas elaborados con un menor contenido de glicerol (para 0,85% (p/p) de glicerol, ΔE es 1,6 y para 1,67% (p/p) de glicerol, ΔE es 0,3, ambos conteniendo 1,34% (p/p) de HPMC). Por otro lado, se registró una tendencia a la disminución para este parámetro, cuando se aumentó el contenido de HPMC para cada nivel de glicerol (ej. para 1,67% (p/p) glicerol, ΔE es 1,8 a 0% (p/p) HPMC y 0,3 para 1,34% (p/p) HPMC).

Se determinó el índice de blancura (WI) y la opacidad de las películas elaboradas con almidón nativo y acetilado y conteniendo 0,85% (p/p) de glicerol (**Tabla 4.5**). Los resultados indicaron que el uso de almidón modificado incrementó significativamente ($p < 0.05$) el color blanco y la opacidad de las películas. Los incrementos fueron del 17,6% para el WI y del 91% para el % opacidad respecto del uso de almidón nativo. Esto coincide con lo observado en la (**Figura 4.7, a y d**) previamente mostradas.

Tabla 4.5. Índice de blancura y % opacidad de películas elaboradas a partir de almidón nativo o acetilado de mandioca, ambos con un nivel de glicerol de 0,85% (p/p).

Sistema	WI	% Opacidad
S4 (AN 3,34 H0 G0,85)	51 ± 3	22 ± 3
S10 (AA 3,34 H0 G0,85)	60 ± 2	42 ± 1

AN: Almidón nativo; AA: Almidón acetilado; H: Hidroxipropil metilcelulosa; G: Glicerol. Los números que acompañan estas letras corresponden al porcentaje (% p/p) de cada componente.

Estos cambios estarían asociados a la presencia de agregados de partículas de almidón acetilado, como se mencionó en el apartado anterior (**ítem 4.1**). Posiblemente, estos agregados permanecerían insolubles, debido a la aglomeración sufrida como consecuencia de las imperfecciones superficiales ocasionadas por el proceso de acetilación.

4.2.3. Espesores de las películas.

El espesor de las películas puede observarse en la **Tabla 4.6.**

Tabla 4.6. Espesores de películas elaboradas a base de almidón nativo o acetilado.

Almidón Nativo	Espesor (mm)	Almidón Acetilado	Espesor (mm)
S1 (AN3,34 H0 G1,67)	0,16 ± 0,01 ^{a}	**S7 (AA3,34 H0 G1,67)**	0,26 ± 0,04 ^{4}
S2 (AN2,67 H0,67 G1,67)	0,15 ± 0,01$^{a\,,\,A}$	**S8 (AA2,67 H0,67 G1,67)**	0,16 ± 0,03^{2,c,A}
S3 (AN2 H1,34 G1,67)	0,13 ± 0,02^{1,B}	**S9 (AA2 H1,34 G1,67)**	0,15 ± 0,03^{3,c,B}
S4 (AN3,34 H0 G0,85)	0,23 ± 0,04 ^{C}	**S10 (AA3,34 H0 G0,85)**	0,23 ± 0,02 $^{4\,,\,C}$
S5 (AN2,67 H0,67 G0,85)	0,11 ± 0,01$^{b,\,D}$	**S11 (AA2,67 H0,67 G0,85)**	0,13 ± 0,03^{2,d,D}
S6 (AN2 H1,34 G0,85)	0,12 ± 0,01$^{1,\,b}$	**S12 (AA2 H1,34 G0,85)**	0,15 ± 0,02 $^{3,\,d}$

Los números que acompañan estas letras corresponden al porcentaje (% p/p) de cada reactivo. Se informa el valor medio ± desvío estándar. Efecto del contenido de glicerol: Valores con el mismo número no difieren significativamente ($p>0,05$). Efecto del contenido de HPMC: Valores con la misma letra minúscula no difieren significativamente ($p>0,05$). Efecto del tipo de almidón: Valores con la misma letra mayúscula no difieren significativamente ($p>0,05$).

El espesor de los sistemas analizados abarcó un rango entre 0,11 y 0,26 mm. Pudo inferirse que, en general, la presencia de HPMC en ambos niveles utilizados, redujo significativamente ($p<0,05$) el espesor de las películas, independientemente del contenido de glicerol utilizado. Estas tendencias, fueron similares tanto para las películas de almidón nativo como acetilado. En el caso del almidón nativo, se observaron reducciones en el espesor de entre un 20 y 53%, mientras que en el caso del almidón acetilado, el agregado de HPMC produjo reducciones de entre un 36 y 45%, en las distintas formulaciones. Ortega-Toro y col. (2014) obtuvieron resultados similares para películas de almidón de maíz y HPMC, y atribuyeron este fenómeno al aumento de la fluidez cuando la HPMC estaba presente en la mezcla, lo cual permitiría

que las cadenas biopoliméricas se dispongan de una manera más compacta luego del secado.

En cuanto al nivel de plastificante no se observaron diferencias significativas para almidón acetilado. En el caso del nativo, se observaron diferencias con el nivel de glicerol para 0% (p/p) y 0,67% (p/p) de HPMC, pero sin una tendencia clara.

El ANOVA de dos factores reveló la existencia de interacciones entre los factores estudiados en el caso de las películas elaboradas con almidón nativo, lo cual podría haber afectado el valor del espesor para estos sistemas (ANEXO I).

Por otro lado, el uso de almidón nativo o acetilado no produjo, globalmente, cambios significativos en el espesor, a excepción de los sistemas S1 vs S7 y S6 vs S12, donde se observó un espesor mayor ($p < 0,05$) para el sistema acetilado en comparación con el uso de almidón nativo.

4.2.4. Ensayo mecánico de tracción

En el presente trabajo se utilizó almidón de mandioca nativo o acetilado para la elaboración de un material de empaquetamiento activo biodegradable. En todos los casos se obtuvieron películas deformables con mayor o menor flexibilidad al tacto dependiendo de la formulación. La caracterización mecánica de las películas proporciona información valiosa acerca de su flexibilidad y resistencia, la cual resulta útil para predecir sus posibles aplicaciones futuras.

En la **Figura 4.10** se detalla el perfil de las curvas de tracción tipo para cada una de las formulaciones ensayadas, mientras que en la **Figura 4.11** se resumen los parámetros mecánicos obtenidos a partir de dichas curvas.

Se observó que las películas presentaban una zona elástica a bajas deformaciones, respondiendo a la ley de Hooke, para luego continuar con una deformación continua o plástica, según la formulación, hasta el punto de ruptura. En general, la disminución del contenido de plastificante, aumentó la resistencia de las películas y disminuyó su deformación, respondiendo al efecto clásico de los plastificantes.

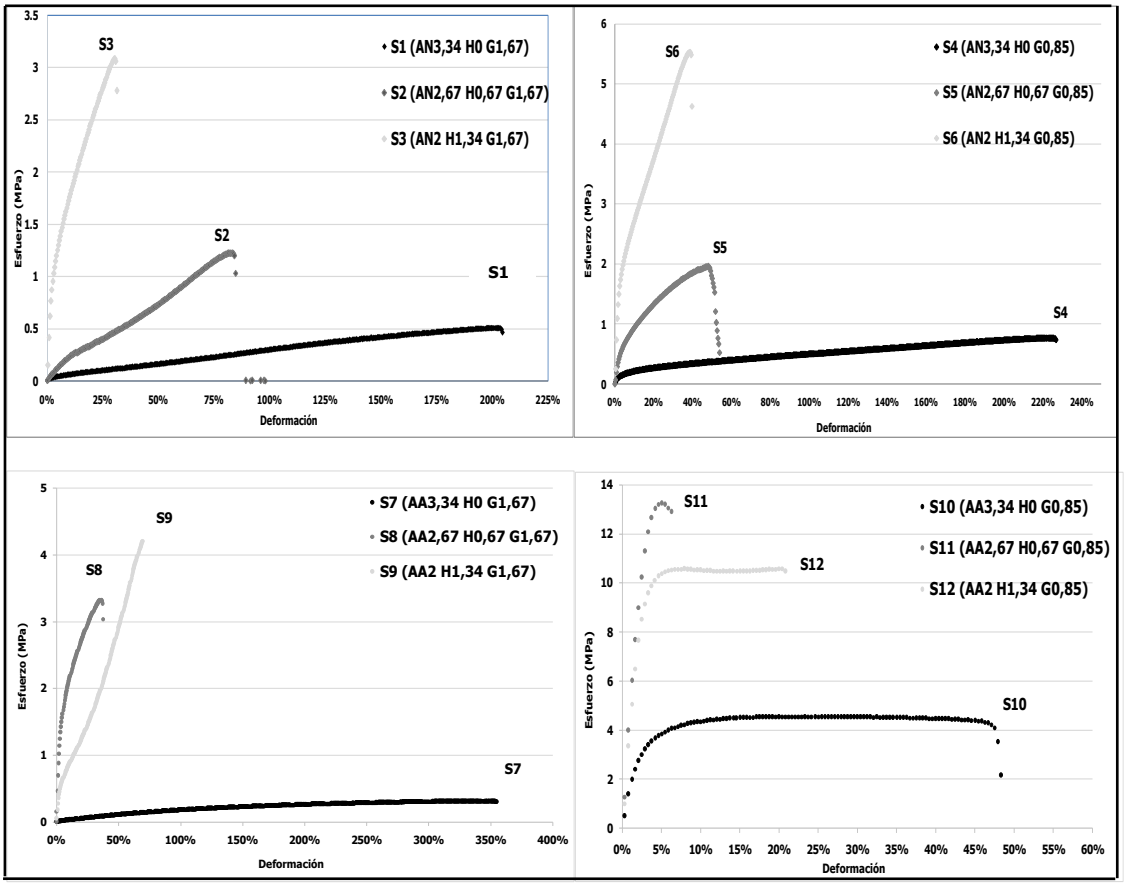

Figura 4.10. Curvas típicas de tracción de películas elaboradas con: a) almidón nativo y glicerol 1,67% (p/p); b) almidón nativo y glicerol 0,85% (p/p); c) almidón acetilado y glicerol 1,67% (p/p); d) almidón acetilado y glicerol 0,85% (p/p). AN: Almidón nativo; AA: Almidón acetilado; H: Hidroxipropil metilcelulosa; G: Glicerol. Los números que acompañan estas letras corresponden al porcentaje (% p/p) de cada reactivo.

4.2.4.1. Películas elaboradas con almidón nativo – efecto del contenido de glicerol y HPMC

Se observó que los parámetros Módulo de Young y Esfuerzo en la ruptura de las películas formuladas con el mayor contenido de plastificante, disminuyen significativamente ($p<0,05$) respecto de los sistemas con menor contenido de glicerol (**Figura 4.11**). Por el contrario, el agregado de HPMC provocó el aumento de dichos parámetros, siendo el incremento mayor a mayor contenido de HPMC. A su vez, la deformación fue mucho menor a medida que aumentaba la cantidad del derivado de celulosa. Este efecto se observó para ambos niveles de glicerol utilizados.

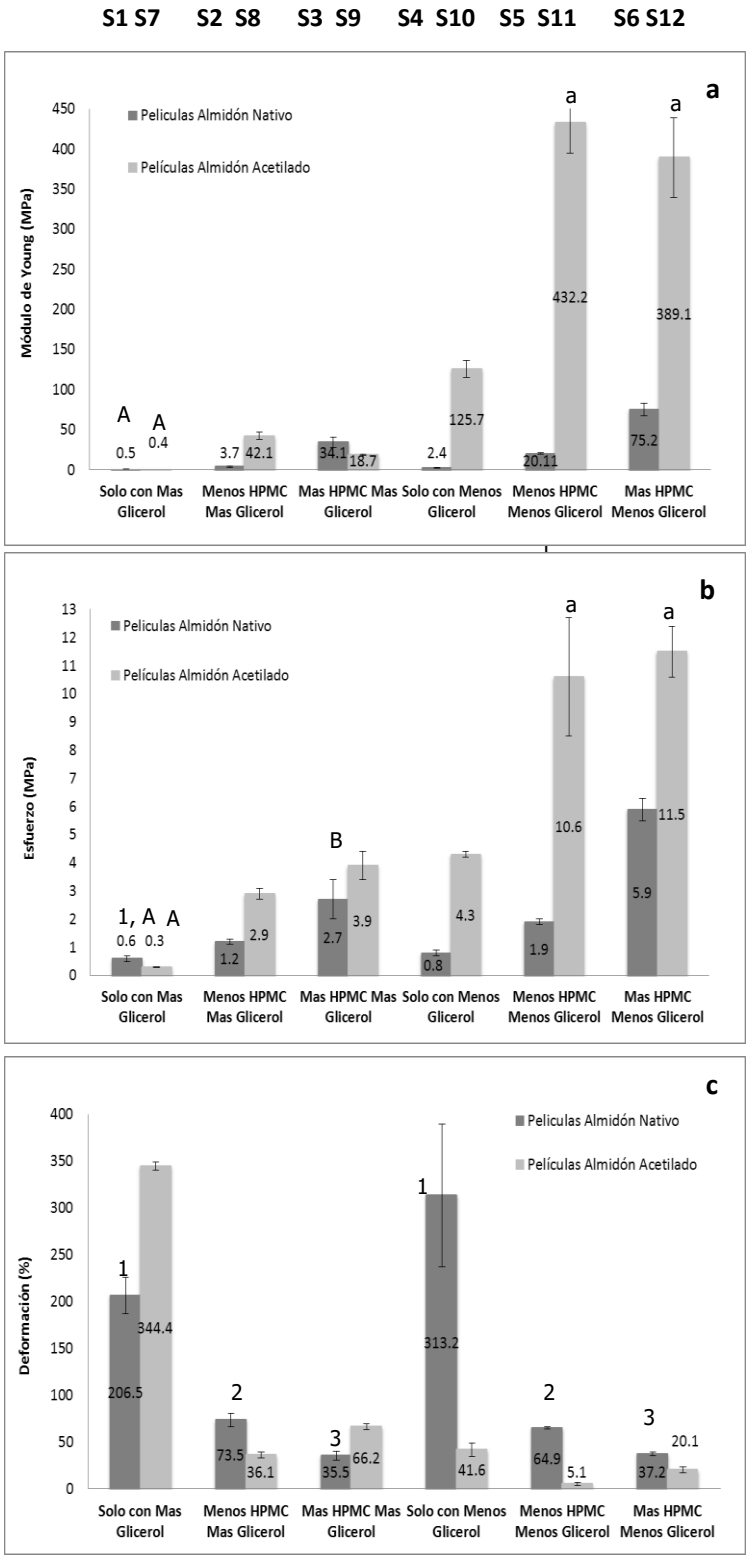

Figura 4.11. Parámetros mecánicos, ensayo de tracción: a) Módulo de Young; b) Esfuerzo en la ruptura; c) deformación en la ruptura. Se informa el valor medio ± desvío estándar. Efecto del contenido de glicerol: Valores con el mismo número no difieren significativamente (p>0,05). Efecto del contenido de HPMC: Valores con la misma letra minúscula no difieren significativamente (p>0,05). Efecto del tipo de almidón: Valores con la misma letra mayúscula no difieren significativamente (p>0,05).

Por otro lado, el contenido de plastificante (a un mismo nivel de HPMC), no modificó sustancialmente la deformación de las películas. Basch y col. (2013) informaron que la incorporación de HPMC a la formulación de películas elaboradas con almidón de mandioca, reforzaba la matriz biopolimérica aumentando la resistencia mecánica (mayor módulo elástico y menor extensibilidad). Estos autores atribuyeron dicho comportamiento a las interacciones entre los biopolímeros, lo cual denotaba una buena compatibilización entre ambos.

4.2.4.2. Películas elaboradas con almidón acetilado – efecto del contenido de glicerol y HPMC

Se puede observar en la **Figura 4.11** que el nivel de glicerol adicionado afectó notablemente las propiedades mecánicas de las películas. Todos los sistemas formulados con mayor contenido de plastificante mostraron la disminución del Módulo de Young y el Esfuerzo en el punto de ruptura, como así también aumentaron la deformación, en comparación con los sistemas con menor cantidad de glicerol. Por otro lado, en general, el Módulo de Young y el Esfuerzo aumentaron con la incorporación de HPMC, observándose los valores más altos para los sistemas con menor nivel de glicerol. En cuanto al efecto del agregado de HPMC, los sistemas con menor contenido de goma, redujeron la deformación a ambos niveles de glicerol respecto a las películas sin HPMC. Sin embargo, el agregado de 1,34% (p/p) de HPMC (películas S9 y S12), evidenció un cambio en el perfil de la curva de tracción (**Figura 4.10 c y d**) mostrando una tendencia, en general significativa, a un menor MY y a una mayor deformación (comportamiento de softening o ablandamiento) respecto de los sistemas con menor contenido de HPMC. Para tratar de explicar este comportamiento, se realizó el ensayo de tracción sobre películas elaboradas con HPMC como único hidrocoloide y con el agregado de 0,85% (p/p) de glicerol (H 3,34 G0,85) y 1,67% (p/p) de glicerol (H 3,34 G1,67). Las curvas Esfuerzo vs Deformación obtenidas se muestran en la **Figura 4.12**, junto con las correspondientes a los sistemas S7 a S12. El sistema (H 3,34 G0,85) presento un módulo de Young de (165±3 MPa) y una deformación a la rotura de (105±3 %) mientras que el sistema con mayor glicerol (H 3,34 G1,67) mostro un módulo de Young de (5,6±0,9 MPa) y una deformación a la rotura de (243±11 %). Como se puede observar en la **Figura 4.12** o comparando estos valores con los reportados en la **Figura 4.11,** el aumento adicional del contenido de HPMC

incrementó la deformación a la rotura y disminuyó el Modulo de Young aun mas. Por lo tanto, en las películas con almidón acetilado, tanto con menor como con mayor contenido de plastificante y 1,34% (p/p) de HPMC, la goma pudo haber gobernado el comportamiento mecánico, mostrando una tendencia a disminuir el módulo de Young y a aumentar la deformación en los sistemas S9 y S12 respecto de los sistemas con menor contenido de goma. Dicho efecto, no fue observado en el caso de las películas con almidón nativo (S3 y S6), posiblemente por presentar este polisacárido una mejor compatibilidad con la HMPC.

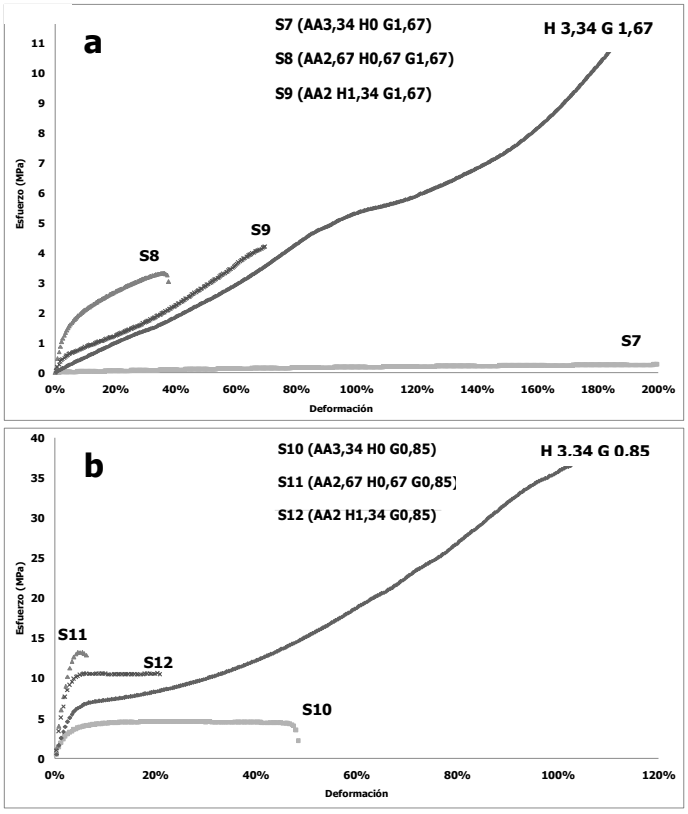

Figura 4.12. Curvas típicas de tracción de películas elaboradas con almidon acetilado: a) 1,67 % (p/p) glicerol y b) 0,85 % (p/p) glicerol. En ambos casos se incorporo el sistema elaborado con HPMC como único hidrocoloide (H3,34).

A partir de estos resultados puede concluirse que el glicerol y la HPMC, ejercieron efectos marcados en las propiedades mecánicas de las películas elaboradas con almidón nativo o acetilado. El glicerol es un conocido plastificante de los materiales biopoliméricos, por lo que produce una reducción en la resistencia a la tracción de las películas y una mayor extensibilidad de las mismas. En investigaciones hechas por

Vieira y col. (2011) se reportó que este plastificante es compatible con la amilosa del almidón ya que disminuye la atracción intermolecular e interfiere con el empaquetamiento de los biopolímeros. Además, la adición de glicerol causa un incremento en la movilidad de las cadenas de amilosa y amilopectina e incrementa la flexibilidad de las películas compensando el efecto de la recristalización que ocurre durante el almacenamiento de sistemas conteniendo almidón. Por otro lado, la presencia de HPMC generó, en general, matrices más resistentes y menos deformables, posiblemente como resultado de una buena interacción entre ambos biopolímeros, lo cual refuerza sus propiedades mecánicas (Basch y col., 2013). A su vez se determinó que, cuando la cantidad de plastificante fue menor 0,85% (p/p), las películas elaboradas con almidón acetilado presentaron valores mayores para el Módulo de Young y para el esfuerzo, mientras que la deformación fue más baja, en comparación con las películas de almidón nativo. Por lo tanto, las películas elaboradas a partir de almidón modificado, mostraron una tendencia a generar matrices más resistentes y menos deformables aunque que ello depende de la formulación. López y col., (2011) utilizaron almidón acetilado de maíz para elaborar películas comestibles y determinaron que se obtiene una matriz más resistente con el uso del almidón modificado debido al refuerzo de la interacción tipo puente de hidrógeno entre las cadenas biopoliméricas alineadas.

El ANOVA de dos factores indicó que las interacciones entre los factores (glicerol y HPMC) fueron significativas, tanto para los valores de esfuerzo, MY y deformación (ANEXO I).

Por otro lado, se realizó la comparación del esfuerzo entre los sistemas considerando la influencia de la fuerza registrada (N) y el espesor (mm) de los especímenes (**Tabla 4.7**).

Tabla 4.7. Resultados obtenidos a partir del ensayo de tracción (máquina universal de testeo Instron) para todos los sistemas de películas.

Sistema	Fuerza (N)	Espesor (mm)	Esfuerzo (MPa)
S1 (AN3,34 H0 G1,67)	1,14 ± 0,02[a]	0,16 ± 0,01[a]	1,18± 0,02[a]
S2 (AN2,67 H0,67 G1,67)	1,25 ± 0,10[a]	0,15 ± 0,01[a]	1,22 ± 0,16[a]
S3 (AN2 H1,34 G1,67)	2,61 ± 0,62	0,13 ± 0,02	3,04 ± 0,73
S4 (AN3,34 H0 G0,85)	1,30 ± 0,21[b]	0,23 ± 0,04	0,86 ± 0,23
S5 (AN2,67 H0,67 G0,85)	1,29 ± 0,17[b]	0,11 ± 0,01[b]	1,89 ± 0,081
S6 (AN2 H1,34 G0,85)	4,19 ± 0,34	0,12 ± 0,01[b]	5,96 ± 0,43
S7 (AA3,34 H0 G1,67)	0,84 ± 0,13	0,26 ± 0,04	0,53 ± 0,04
S8 (AA2,67 H0,67 G1,67)	2,67 ± 0,41[c]	0,16 ± 0,03[c]	2,81 ± 0,29[b]
S9 (AA2 H1,34 G1,67)	2,70 ± 0,44[c]	0,15 ± 0,03[c]	2,95 ± 0,71[b]
S10 (AA3,34 H0 G0,85)	6,06 ± 0,96	0,23 ± 0,02	4,39 ± 0,69
S11 (AA2,67 H0,67 G0,85)	8,55 ± 1,20	0,13 ± 0,03[d]	11,09 ± 1,49[c]
S12 (AA2 H1,34 G0,85)	10,02 ± 0,72	0,15 ± 0,02[d]	11,08 ± 0,84[c]

AN: Almidón nativo; AA: Almidón acetilado; H: Hidroxipropil metilcelulosa; G: Glicerol; Los números que acompañan estas letras corresponden al porcentaje (% p/p) de cada reactivo.
Se informa el valor medio ± desvío estándar. Valores con la misma letra minúscula no difieren significativamente (p>0,05) para cada columna considerando igual tipo de almidón e igual nivel de plastificante.

De acuerdo a los resultados, en general, el incremento en el esfuerzo debido al agregado de HPMC a la formulación, fue consecuencia de un menor espesor desarrollado tanto en las películas elaboradas con almidón nativo como acetilado. A su

vez, y, de manera general, el mayor valor de la fuerza registrada en la ruptura para los sistemas conteniendo HPMC, contribuyó al aumento del valor del esfuerzo (**Tabla 4.7**).

Como conclusión general, se puede decir que en los sistemas con almidón acetilado y menor cantidad de glicerol, los valores del esfuerzo fueron mayores que en los sistemas con almidón nativo y menor concentración de glicerol.

4.2.5. Contenido de humedad de las películas

En el presente trabajo se observó, una tendencia a una mayor cantidad de humedad de las películas con el mayor contenido de glicerol para ambos almidones estudiados (**Tabla 4.8**). En estudios realizados por Farhan y Hani (2017) se reportó que en general, un incremento del contenido de humedad puede ser atribuido a la naturaleza hidrofílica del glicerol. Ello determinaría la tendencia observada. En general, los mayores valores de humedad se registraron a la concentración de HPMC de 1,34 % para un nivel de glicerol y tipo de almidón constantes. En cuanto al efecto del tipo de almidón, el uso de almidón acetilado generó, en muchos sistemas, películas de menor humedad en comparación con el uso de almidón nativo, lo cual se corresponde con los resultados obtenidos en el análisis de los espectros FTIR (reducción de la banda a 1645 cm^{-1}).

Tabla 4.8. Contenido de humedad (% b.s.) de películas nativas y acetiladas

SISTEMAS ALMIDÓN NATIVO		SISTEMAS ALMIDÓN ACETILADO	
S1 (AN3,34 H0 G1,67)	$36 \pm 2^{a,A}$	**S7 (AA3,34 H0 G1,67)**	$33 \pm 4^{c,A}$
S2 (AN2,67 H0,67 G1,67)	$36 \pm 4^{a,b,B}$	**S8 (AA2,67 H0,67 G1,67)**	$44 \pm 4^{d,B}$
S3 (AN2 H1,34 G1,67)	$48 \pm 7^{b,1,C}$	**S9 (AA2 H1,34 G1,67)**	$36 \pm 5^{c,d,C}$
S4 (AN3,34 H0 G0,85)	25 ± 2	**S10 (AA3,34 H0 G0,85)**	19 ± 1^{e}
S5 (AN2,67 H0,67 G0,85)	17 ± 1	**S11 (AA2,67 H0,67 G0,85)**	21 ± 1^{e}
S6 (AN2 H1,34 G0,85)	46 ± 1^{1}	**S12 (AA2 H1,34 G0,85)**	28 ± 2

Los números que acompañan estas letras corresponden al porcentaje (% p/p) de cada reactivo. Se informa el valor medio ± desvío estándar. Efecto del contenido de glicerol: Valores con el mismo número no difieren significativamente ($p>0,05$). Efecto del contenido de HPMC: Valores con la misma letra minúscula no difieren significativamente ($p>0,05$). Efecto del tipo de almidón: Valores con la misma letra mayúscula no difieren significativamente ($p>0,05$).

Las tendencias observadas estarían vinculadas a la existencia de interacciones entre los factores estudiados (ANEXO I).

4.2.6. Solubilidad en agua

En la **Figura 4.13** se resumen los resultados del ensayo de solubilidad en agua de las películas estudiadas. Los valores de solubilidad abarcaron un rango entre 20 y 65%.

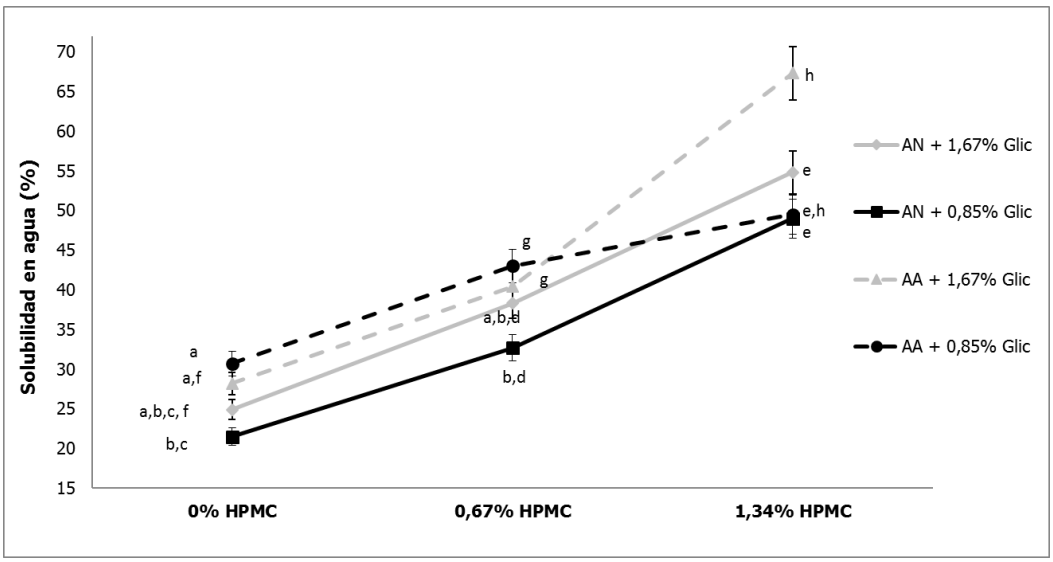

Figura 4.13. Solubilidad en agua de películas elaboradas con almidón nativo y acetilado con diferentes niveles de glicerol y HPMC. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas (p>0,05) para un mismo nivel de HPMC.

Se observó que la solubilidad de las películas elaboradas con almidón nativo y en ausencia de HPMC, fue significativamente menor que en presencia del derivado de celulosa, independientemente del contenido de glicerol. A ambos niveles de plastificante, la solubilidad aumentó a medida que se incrementaba el contenido de HPMC. A su vez, todas las películas nativas con menor cantidad de glicerol presentaron una leve disminución no significativa, en el valor de solubilidad respecto a aquellas con mayor cantidad de glicerol. Espinel y col. (2014) reportaron que una disminución en el contenido de HPMC y un aumento en el contenido de almidón de mandioca, disminuía la solubilidad. Lo anterior sugiere que la adición de HPMC a las películas de almidón genera una matriz más susceptible a la interacción con el agua.

En los sistemas con almidón acetilado, el efecto del glicerol y de la HPMC en la solubilidad mostró una tendencia similar al observado para el almidón nativo. Sin embargo, en general, los valores de solubilidad presentaron una tendencia a valores más altos en todos los sistemas acetilados respecto de los análogos pero con almidón nativo. Posiblemente, la incorporación de grupos acetatos a la molécula de almidón haya dificultado el acercamiento de las cadenas del biopolímero y, por lo tanto, se obtuvo en este caso una matriz menos compacta, de mayor interacción con el agua y más soluble.

Acorde al ANOVA de dos factores, los sistemas acetilados presentaron interacciones significativas entre los factores estudiados, lo cual podría incidir en los mayores valores obtenidos. De acuerdo a los resultados obtenidos, es posible controlar la solubilidad de películas elaboradas con HPMC/almidón/glicerol, cambiando la proporción de los biopolímeros usados en su fabricación y el tipo de almidón usado.

4.2.7. Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

En la **Figura 4.14** se muestran los valores de la permeabilidad al vapor de agua de las películas estudiadas. Se puede observar que las películas elaboradas con almidón nativo y 1,67 % (p/p) de glicerol presentaron mayor PVA en comparación con las que contenían 0,85% (p/p) de plastificante; en particular, la formulación sin HPMC y 1,67 % (p/p) resultó la más permeable de todas las películas ensayadas (S1). Por el contrario, la presencia de HPMC mejoró la capacidad de barrera para los sistemas con 1,67% (p/p) de glicerol. Para este almidón, los sistemas con más baja PVA fueron S4, S5 y S6, todos con 0,85% (p/p) de glicerol y para todos los niveles de HPMC.

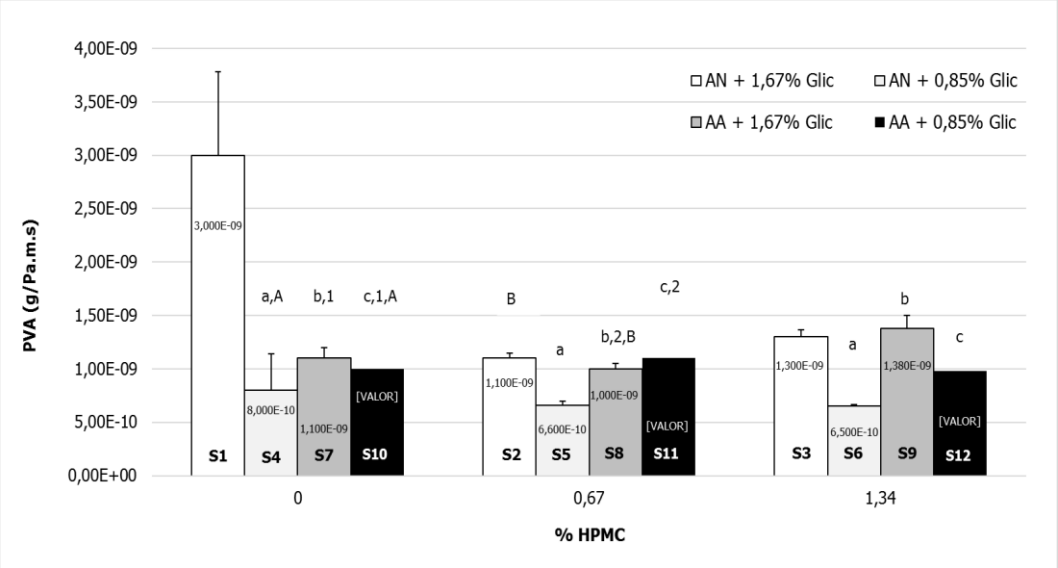

Figura 4.14. Permeabilidad al vapor de agua de películas elaboradas con almidón nativo y acetilado con diferentes niveles de glicerol y HPMC. Se informa el valor medio ± desvío estándar. Efecto del contenido de glicerol: Valores con el mismo número no difieren significativamente (p>0,05). Efecto del contenido de HPMC: Valores con la misma letra minúscula no difieren significativamente (p>0,05). Efecto del tipo de almidón: Valores con la misma letra mayúscula no difieren significativamente (p>0,05).

En las películas de almidón acetilado, en general, no se observaron diferencias significativas entre todos los sistemas, siendo la PVA promedio para estos sistemas (1,10±0,05) x 10^{-9} g / Pa m s.

Es de destacar que, en el caso de las películas elaboradas con almidón nativo, se observaron interacciones significativas, según el ANOVA de dos factores (ANEXO I) entre los factores glicerol e HPMC.

Se realizó la comparación de la PVA entre los sistemas considerando particularmente la influencia de la velocidad de transmisión y el espesor (**Tabla 4.9**).

Se observó que, en general, tanto para los sistemas elaborados con almidón nativo o acetilado, el agregado de HPMC disminuyó el espesor de las películas a la vez que aumentó el valor de la pendiente (G/t). En el caso de las matrices de almidón acetilado y nativo, estas variaciones se compensaron entre si, arrojando valores de PVA similares para los sistemas S7 a S12 y S4 a S6. En el caso de las películas con almidón nativo y 1,67% (p/p) de glicerol (S1 a S3) el efecto de la disminución del espesor cuando la goma fue agregada, tuvo el mayor efecto, reduciendo el valor de la PVA en los sistemas S2 y S3 respecto a S1.

Tabla 4.9. Resultados obtenidos a partir del ensayo de PVA para todos los sistemas de películas de almidón.

Sistema	PVA x 10^9 (g/Pa m s)	G/t (g / h)	Espesor (mm)
S1 (AN3,34 H0 G1,67)	5,8 ± 0,8	0,087 ± 0,002 [a]	0,16 ± 0,01[a]
S2 (AN2,67 H0,67 G1,67)	1,10 ± 0,05	0,092 ± 0,005 [a]	0,15 ± 0,01[a]
S3 (AN2 H1,34 G1,67)	1,4 ± 0,1	0,106 ± 0,006	0,13 ± 0,02
S4 (AN3,34 H0 G0,85)	1,3 ± 0,3 [a]	0,083 ± 0,007	0,23 ± 0,04
S5 (AN2,67 H0,67 G0,85)	0,94 ± 0,04 [a]	0,106 ± 0,006 [b]	0,11 ± 0,01[b]
S6 (AN2 H1,34 G0,85)	1,00 ± 0,01 [a]	0,106 ± 0,006 [b]	0,12 ± 0,01[b]
S7 (AA3,34 H0 G1,67)	1,1 ± 0,1 [b]	0,056 ± 0,003	0,26 ± 0,04
S8 (AA2,67 H0,67 G1,67)	1,10 ± 0,05 [b]	0,087 ± 0,002	0,16 ± 0,03[c]
S9 (AA2 H1,34 G1,67)	1,1 ± 0,1 [b]	0,059 ± 0,001	0,15 ± 0,03[c]
S10 (AA3,34 H0 G0,85)	1,0 ± 0,2 [c]	0,054 ± 0,013	0,23 ± 0,02
S11 (AA2,67 H0,67 G0,85)	1,1± 0,4 [c]	0,078 ± 0,025	0,13 ± 0,03[d]
S12 (AA2 H1,34 G0,85)	0,98 ± 0,11 [c]	0,083 ± 0,005	0,15 ± 0,02[d]

AN: Almidón nativo; AA: Almidón acetilado; H: Hidroxipropil metilcelulosa; G: Glicerol. Los números que acompañan estas letras corresponden al porcentaje (% p/p) de cada componente. G/t: corresponde a la pendiente obtenida a partir del incremento de peso de las celdas en función del tiempo.
Se informa el valor medio ± desvío estándar. Valores con la misma letra minúscula no difieren significativamente (p>0,05) para cada columna considerando igual tipo de almidón e igual nivel de plastificante.

La película constituida por almidón nativo, en ausencia de HPMC y con glicerol 1,67% (p/p), presentó la PVA más alta (~340% más alta que su equivalente con

0,85% (p/p) de plastificante), lo cual revela el importante efecto del contenido de glicerol en esta propiedad. Este resultado se ve minimizado en presencia de HPMC. En investigaciones realizadas por López y col. (2013) se mostró que, al usar almidón y glicerol, ambos ejercen un efecto positivo sobre esta propiedad, siendo el plastificante el que ejerce el efecto más importante. Basch y col. (2013) informaron valores de 1,4 - 1,6 x 10^{-9} g/Pa m s para la PVA de películas elaboradas a partir de almidón de mandioca nativo, HPMC y glicerol. En el caso de las películas acetiladas, la cantidad de plastificante o HPMC, no tuvo un impacto marcado en esta propiedad, la cual resultó similar (en promedio) a la permeabilidad de las películas nativas con mayor contenido de plastificante y en presencia de HPMC. En ausencia de HPMC y con el mayor contenido de glicerol, el uso de almidón modificado disminuyó significativamente la PVA respecto al almidón nativo.

4.2.8. Microestructura

A fin de analizar los cambios introducidos en la microestructura de las películas por el uso de diferentes proporciones de glicerol y HPMC, se realizaron estudios de microscopía óptica y diferencial de barrido (ESEM), como se muestra a continuación.

4.2.8.1. Microscopía óptica

En la **Figura 4.15** se muestran las imágenes obtenidas con el microscopio óptico de las superficies (expuestas al secado) de películas películas elaboradas con almidón nativo con y sin HPMC.

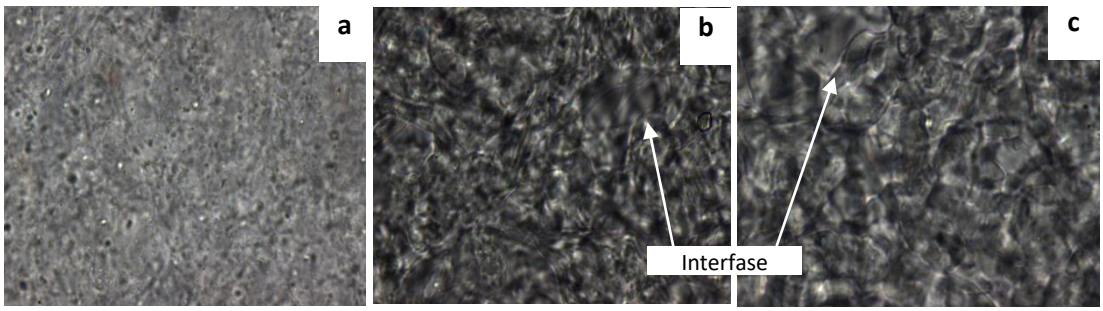

Figura 4.15. Imágenes obtenidas con el microscopio óptico de las superficies de las películas S4 (AN3,34 H0 G0,85) (a), S5 (AN2,67 H0,67 G0,85) (b) y S6 (AN2 H1,34 G0,85) (c) correspondientes a almidón nativo y glicerol 0,85% (p/p). Magnificación: 400X. AN: Almidón nativo; AA: Almidón acetilado; H: Hidroxipropil metilcelulosa; G: Glicerol. Los números que acompañan estas letras corresponden al porcentaje (% p/p) de cada componente.

La **Figura 4.15** muestra la estructura de las películas elaboradas con almidón nativo en presencia de HPMC (sistemas S5 y S6, **Figuras 4.15b y c** respectivamente). Se observa que son matrices con más de una fase, correspondientes a zonas ricas en almidón y otras ricas en HPMC y con una mayor heterogeneidad que las películas cosntituidas con la formulación S4 (**Figura 4.15a**). Fue posible también apreciar las líneas de discontinuidad de la matriz, es decir las interfases. En un trabajo publicado por Jiménez y col., (2012), se estudió la microestructura de películas a base de almidón de maíz y HPMC mediante análisis de micrografías SEM. Los autores establecieron que los sistemas preparados con mezcla de ambos polisacáridos mostraron una estructura heterogénea con separación de fases debido a la falta de miscibilidad entre los biopolímeros.

4.2.8.2. Microscopía diferencial de barrido ambiental (ESEM)

En la **Figuras 4.16** a **4.19** se muestran imágenes ESEM de la topografía (superficie por donde el solvente se evapora durante el secado) y de la zona de fractura de las películas estudiadas.

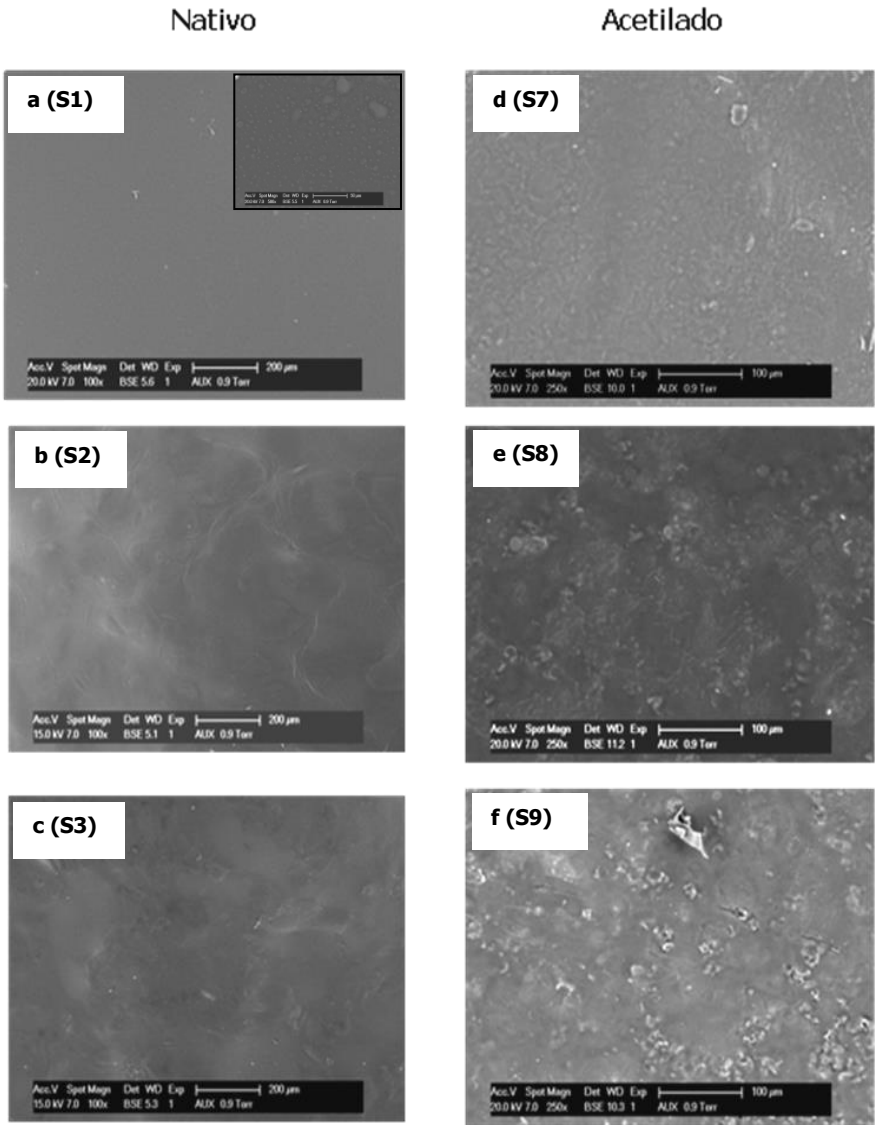

Figura 4.16. Micrografías (ESEM) de la superficie de películas elaboradas con almidón nativo (izquierda, magnificación 100X) y almidón acetilado (derecha, magnificación 250X) con mayor contenido de glicerol 1,67% (p/p) y distintos niveles de HPMC (% p/p). En el inserto: almidón nativo sin HPMC a 500X. Abreviaturas: S1 (AN3,34 H0 G1,67); S2 (AN2,67 H0,67 G1,67); S3 (AN2 H1,34 G1,67); S7 (AA3,34 H0 G1,67); S8 (AA2,67 H0,67 G1,67); S9 (AA2 H1,34 G1,67).

Nativo **Acetilado**

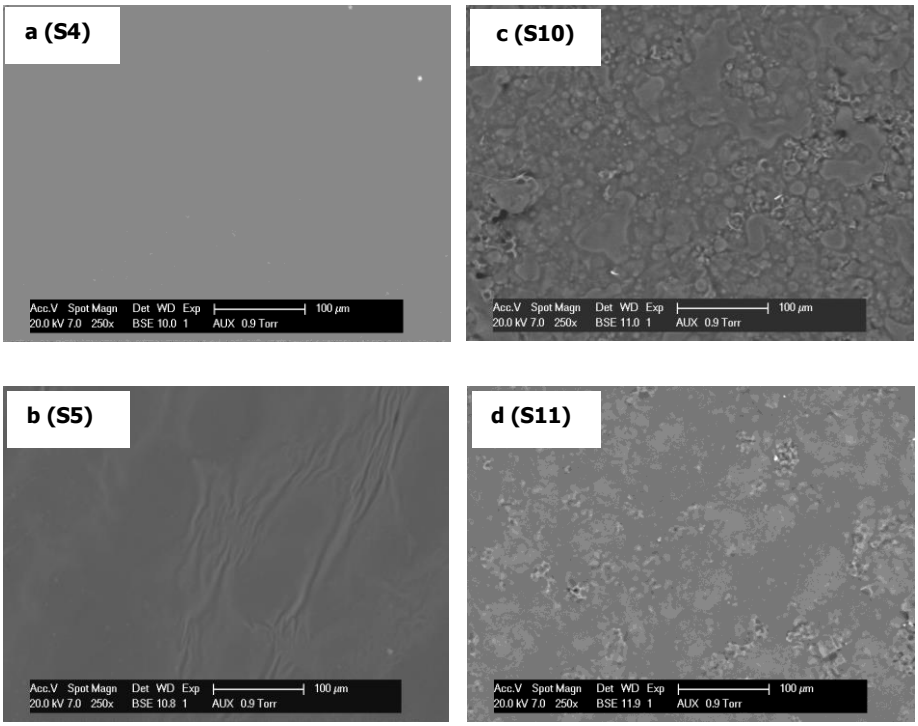

Figura 4.17. Micrografías (ESEM) de la superficie de películas elaboradas con almidón nativo (izquierda, magnificación 250X) y almidón acetilado (derecha, magnificación 250X) con menor contenido de glicerol 0,85% (p/p) y distintos niveles de HPMC (% p/p). Abreviaturas: S4 (AN3,34 H0 G0,85); S5 (AN2,67 H0,67 G0,85); S10 (AA3,34 H0 G0,85); S11 (AA2,67 H0,67 G0,85). AN: Almidón nativo; AA: Almidón acetilado; H: Hidroxipropil metilcelulosa; G: Glicerol. Los números que acompañan estas letras corresponden al porcentaje (% p/p) de cada componente.

Se observó que las películas S1 (almidón nativo, glicerol 1,67% (p/p) con y sin HPMC) presentaron una superficie continua, con presencia de estructuras globulares de entre 4 y 30 μm de diámetro (inserto en **Figura 4.16a**), homogéneamente distribuidas. Cuando la concentración de glicerol fue más baja 0,85% (p/p), dichas estructuras se apreciaron en menor medida, generando una superficie de apariencia más lisa (**Figura 4.17a**). En presencia de 0,67 % (p/p) y 1,34 % (p/p) de HPMC se observaron zonas de distinta rugosidad superficial, como así también las interfases entre ellas (**Figura 4.16c y b**). Estas diferentes fases corresponderían a zonas ricas en almidón y otras ricas en HPMC, de diferente microestructura superficial. En el caso de las películas con HPMC 0,67% (p/p) con menor cantidad de plastificante (**Figura**

4.17b) el aspecto general fue de una superficie más lisa y uniforme en comparación con las películas más plastificadas.

Por otro lado, las películas elaboradas con almidón acetilado, presentaron una topografía más irregular que las fabricadas con almidón nativo, a ambos niveles de glicerol y en presencia o no de HPMC (**Figura 4.16d-f y 4.17c-d**)**.** Se observaron partículas que corresponderían a agregados insolubles de almidón acetilado. A su vez, con el agregado de HPMC, se observaron nuevamente las zonas de distinta rugosidad superficial, como en el caso de las películas de almidón nativo, para ambos niveles de glicerol ensayados.

A fines comparativos, se elaboraron películas con HPMC 3,34% (p/p) y plastificadas con 0,85% (p/p) de glicerol (**Figura 4.18a**). Se observó una superficie lisa y regular. Esta observación sugeriría que las zonas lisas observadas en películas elaboradas con la mezcla almidón nativo o acetilado y HPMC, corresponderían a zonas ricas en el derivado de celulosa. De acuerdo a Jiménez y col. (2012), películas elaboradas a partir de almidón de maíz o de HPMC resultaron altamente homogéneas mientras que la mezcla de ambos biopolímeros incrementó la heterogeneidad, generando una matriz con separación de fases. Resultados similares fueron reportados por Espinel y col. (2014).

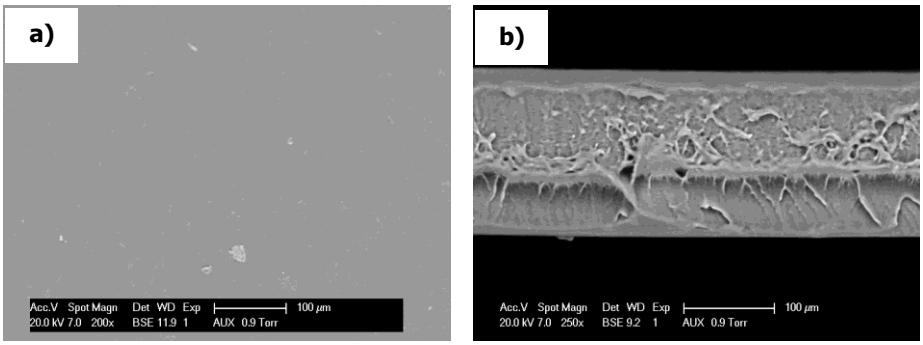

Figura 4.18. Micrografías (ESEM) de la superficie (izquierda, magnificación 200X) y de la zona de fractura (perfil) (derecha, magnificación 150X) de películas elaboradas con HPMC 3,34% (p/p) y menor contenido de glicerol 0,85% (p/p).

Nativo **Acetilado**

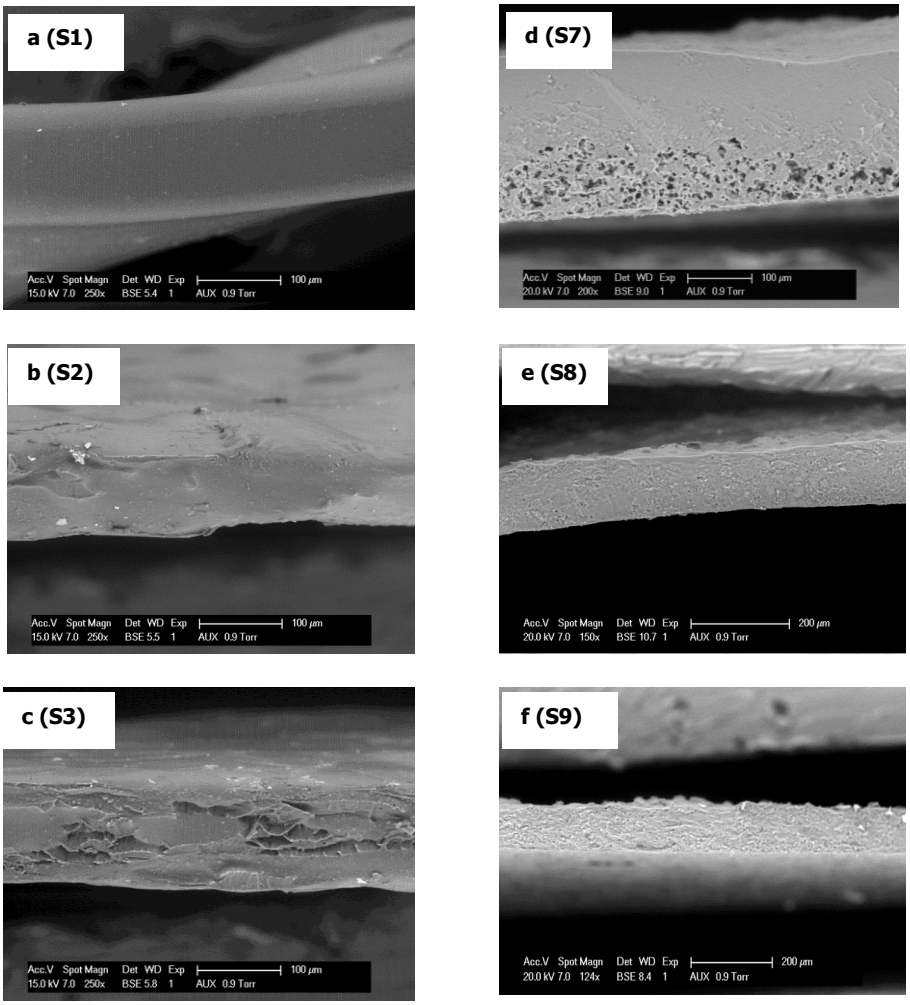

Figura 4.19. Micrografías (ESEM) de la zona de fractura (perfil) de películas elaboradas con almidón nativo (izquierda, magnificación 250X) y/o almidón acetilado (derecha, magnificación 120-150X) con mayor contenido de glicerol 1,67% (p/p) y distintos niveles de HPMC (% p/p). Abreviaturas: S1 (AN3,34 H0 G1,67); S2 (AN2,67 H0,67 G1,67); S3 (AN2 H1,34 G1,67); S7 (AA3,34 H0 G1,67); S8 (AA2,67 H0,67 G1,67); S9 (AA2 H1,34 G1,67). AN: Almidón nativo; AA: Almidón acetilado; H: Hidroxipropil metilcelulosa; G: Glicerol. Los números que acompañan estas letras corresponden al porcentaje (% p/p) de cada componente.

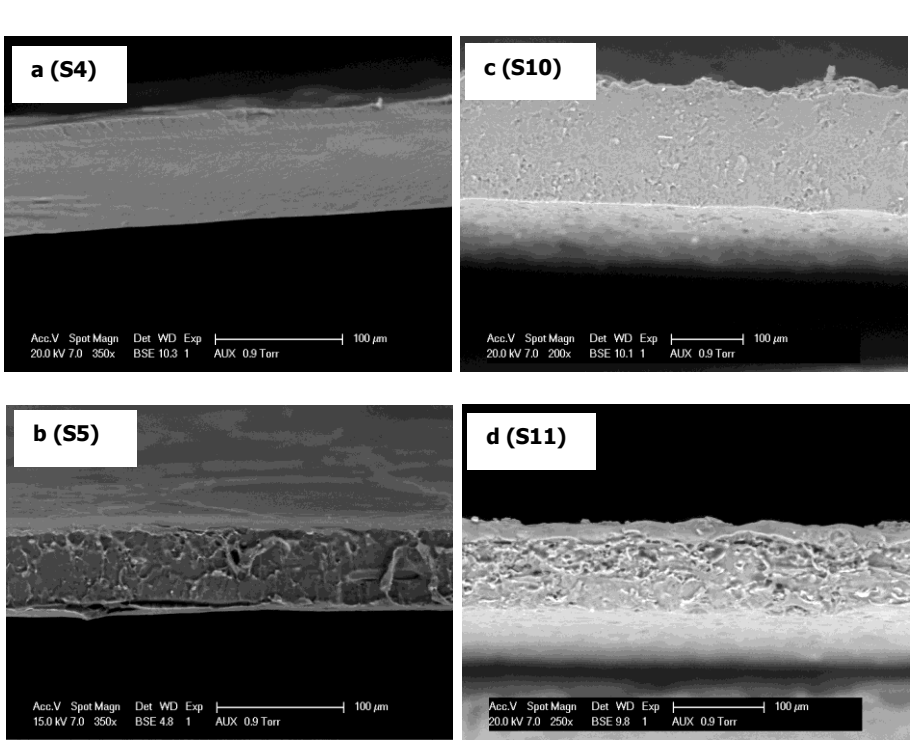

Figura 4.20. Micrografías (ESEM) de la zona de fractura (perfil) de películas elaboradas con almidón nativo (izquierda, magnificación 350X) y/o almidón acetilado (derecha, magnificación 200-250X) con menor contenido de glicerol 0,85% (p/p) y distintos niveles de HPMC (% p/p). Abreviaturas: S4 (AN3,34 H0 G0,85); S5 (AN2,67 H0,67 G0,85); S10 (AA3,34 H0 G0,85); S11 (AA2,67 H0,67 G0,85). AN: Almidón nativo; AA: Almidón acetilado; H: Hidroxipropil metilcelulosa; G: Glicerol. Los números que acompañan estas letras corresponden al porcentaje (% p/p) de cada componente.

Las zonas de fractura de las películas de almidón nativo, a ambos niveles de glicerol y en ausencia de HPMC, se presentaron compactas, homogéneas y con bordes bien definidos **(Figuras 4.19a y 4.20a**). Al incorporar HPMC a la formulación, la heterogeneidad aumentó notablemente a medida que se incrementaba el contenido de HPMC, observándose en algunos casos una disposición "en capas" y presencia de poros (**Figuras 4.19b-c y 4.20b**). Dicha heterogeneidad dependió del contenido de plastificante (**Figuras 4.19b y 4.20b**).

En el caso del almidón acetilado, las películas sin HPMC e independientemente de la cantidad de glicerol (**Figuras 4.19d y 4.20c**), fueron densas, pero con presencia de partículas y poros que incrementaron la heterogeneidad. En presencia de HPMC se observó un aumento de la heterogeneidad, al igual que en el caso del almidón nativo (**Figuras 4.19e-f y 4.20d**).

A su vez, puede apreciarse, que el perfil de las películas elaboradas solo con HPMC (**Figuras 4.18b**) fue compacto presentando características similares a las películas constituidas con almidón nativo o acetilado, y HPMC, mostrando el efecto de la goma en esta última estructura.

A partir de estas observaciones, se puede concluir que la mezcla de biopolímeros dio origen a matrices heterogéneas, con presencia de fases separadas. El empleo de almidón acetilado generó películas del tipo compuestas, debido a agregados insolubles de partículas de almidón sin gelatinizar, que funcionarían como material de relleno. Este hecho explicaría, en parte, el aumento del Módulo de Young y del esfuerzo a la ruptura de las películas acetiladas.

4.2.9. Ángulo de gota en contacto con la superficie

El valor del ángulo que forma una gota de líquido, en contacto con la superficie de las películas, ofrece una indicación del grado de hidrofilicidad / hidrofobicidad de la superficie en cuestión. Dicho ángulo puede variar entre 0 y 180º, siendo un valor menor a 20º indicativo de una superficie hidrofílica, es decir con buena interacción con el agua mientras que un valor mayor a 70º, indicaría una superficie hidrofóbica. Cabe aclarar que la magnitud del ángulo de contacto estará influenciada por la formulación de las películas (tipo y cantidad de biopolímeros, plastificantes, antimicrobianos, etc.) y su procesamiento, los cuales determinan la tensión superficial del material. Se ha reportado que las características topográficas de la superficie, por ejemplo, su rugosidad y las características químicas de la superficie a tratar (contenido de humedad superficial, grupos funcionales polares expuestos en la superficie, etc.) son los principales factores que afectan el valor del ángulo (Bastos y col., 2013).

En la **Tabla 4.10** se detallan los ángulos de contacto evaluados en las películas.

Tabla 4.10. Ángulo de contacto de una gota de agua sobre la superficie de películas

SISTEMAS ALMIDÓN NATIVO		**SISTEMAS ALMIDÓN ACETILADO**	
S1 (AN3,34 H0 G1,67)	8 ± 3*	**S7 (AA3,34 H0 G1,67)**	16 ± 2[d]
S2 (AN2,67 H0,67 G1,67)	28 ± 1[a]	**S8 (AA2,67 H0,67 G1,67)**	14 ± 2[d]
S3 (AN2 H1,34 G1,67)	N.D.	**S9 (AA2 H1,34 G1,67)**	N.D.
S4 (AN3,34 H0 G0,85)	30 ± 3[a]	**S10 (AA3,34 H0 G0,85)**	5,2 ± 0,8
S5 (AN2,67 H0,67 G0,85)	25 ± 4[a, c]	**S11 (AA2,67 H0,67 G0,85)**	19 ± 2[b, c]
S6 (AN2 H1,34 G0,85)	12 ± 3	**S12 (AA2 H1,34 G0,85)**	22 ± 3[b, c]

*: Ollé y col. (2014b). N.D.: no determinado. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas (p>0,05). AN: Almidón nativo; AA: Almidón acetilado; H: Hidroxipropil metilcelulosa; G: Glicerol. Los números que acompañan estas letras corresponden al porcentaje (% p/p) de cada componente.

Puede observarse que las películas de almidón nativo con menor contenido de glicerol y sin el agregado de HPMC, presentaron el mayor ángulo de contacto siendo su valor de (30 ± 3) º. Este resultado concuerda con el reportado por Ollé y col. (2014b) para películas elaboradas con almidón de mandioca y glicerol en similar proporción a la empleada para el sistema S4. Por otro lado, el agregado de HPMC, provocó un descenso significativo (60%) en el caso de incorporar 1,34% (p/p) de HPMC a la formulación. Dicha tendencia estaría vinculada a las características diferenciales de rugosidad superficial y de microestructura de las películas y, eventualmente, a una mayor exposición de grupos hidrofílicos en la superficie entre sistemas. Rotta y col. (2009) elaboraron películas a partir de mezclas de quitosano y HPMC, y observaron que a medida que se incrementaba el contenido de la goma, disminuía el ángulo de contacto de una gota de agua, lo cual fue atribuido a la introducción de grupos polares conteniendo oxígeno, aumentando las interacciones entre dichos grupos y el agua. A su vez, Bastos y col. (2013) reportaron en su trabajo que, al realizar modificaciones en

la superficie de películas de almidón de maíz a través de tratamientos con plasma, era posible obtener una superficie más hidrofóbica de las películas y, que el ángulo de contacto luego de cada tratamiento era fuertemente dependiente de factores como la microestructura local generada, de su rugosidad, como así también del grado de reticulación alcanzado por el almidón. Estos autores establecieron que a medida que aumentaba la rugosidad de la superficie, aumentaba el valor del ángulo de contacto de la gota. A fines comparativos, se determinó el ángulo de contacto en películas constituidas solamente con HPMC y 0,85% (p/p) de glicerol, siendo el valor promedio de (15 ± 2)º. Este resultado es significativamente menor que el obtenido para un sistema equivalente, pero a partir de almidón nativo (S4) y explica, en parte, la reducción del ángulo medido cuando se incorpora la goma a la formulación en presencia de almidón nativo, 0,85% (p/p) de glicerol y 1,34% (p/p) de HPMC. En los restantes casos probablemente la rugosidad y características microestructurales haya afectado esta tendencia. Cabe señalar que un aumento en la cantidad de plastificante, tendería a disminuir el ángulo de contacto por una mayor hidrofilicidad del sistema de acuerdo con Ollé y col. (2014b). Sin embargo, para la película S2, por ejemplo, no se registraron diferencias respecto de la S5, posiblemente por el interjuego de la formulación, rugosidad y características microestructurales.

Por otro lado, se observó que el empleo de almidón acetilado (S8, S10) disminuyó el valor del ángulo, en comparación con el uso de almidón nativo (S2, S4). A su vez, el agregado de HPMC incrementó el ángulo (S12 vs S10), sin observarse diferencias significativas ($p>0,05$) entre los dos niveles de HPMC ensayados en presencia de 0,85% (p/p) de glicerol para este almidón. Este resultado, probablemente esté afectado por las características microestructurales y rugosidad de los sistemas acetilados. En cuanto a las películas constituidas con almidón acetilado y el efecto del glicerol, la tendencia no es clara.

4.2.10. Análisis de los espectros FTIR

Con el objeto de verificar posibles interacciones entre los biopolímeros constituyentes de las películas o entre estos y otros componentes de las películas, se registraron los espectros FTIR de sistemas seleccionados. Dichas interacciones pueden manifestarse a través del desplazamiento o ensanchamiento de bandas de absorción

de energía ante la presencia de una nueva sustancia en la formulación. En la **Figura 4.21** se observan los espectros de películas obtenidas a partir de almidón nativo. Pueden apreciarse las bandas características del almidón nativo: estiramientos del enlace C-O a 934 cm^{-1} **(A)** y 1154 cm^{-1} **(A)**, estiramientos del enlace C-O del anillo de anhidroglucosa a 1020 y 1078 cm^{-1} **(B)** y la vibración de los grupos O-H de las moléculas de agua fuertemente enlazadas a la estructura del almidón a 1650 cm^{-1} **(C)** (banda intensa). También se observa una importante banda correspondiente al estiramiento C-H de los CH_2 en el anillo de glucosa a 2932 cm^{-1} **(D)** y una banda muy amplia entre 3050 y 3600 cm^{-1} **(E)**, asociada al estiramiento de los grupos O-H tanto libres como intervinientes en enlaces tipo puente de H intra o inter molecular. La presencia del antimicrobiano sorbato de potasio, aporta una banda a 1545 cm^{-1} **(F)** característica del estiramiento asimétrico del grupo carboxilato ($-CO_2^-$).

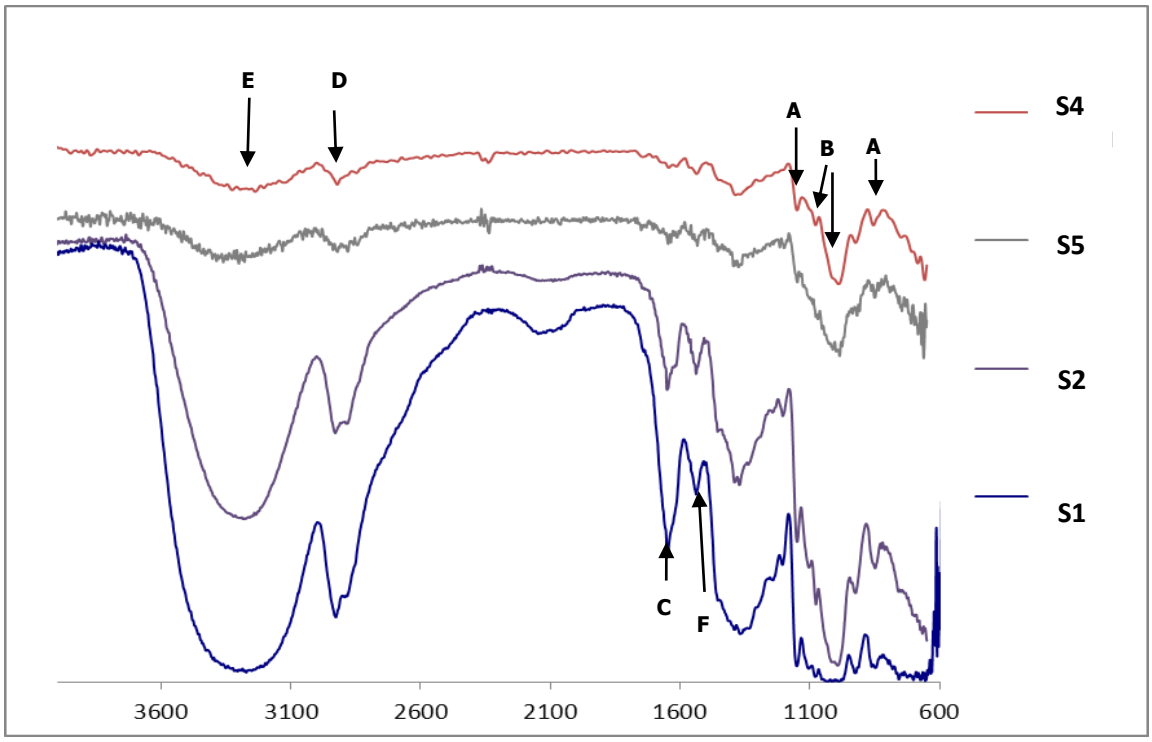

Figura 4.21. Espectro FTIR de películas elaboradas con almidón nativo. Abreviaturas: S4 (AN3,34 H0 G0,85); S5 (AN2,67 H0,67 G0,85); S2 (AN2,67 H0,67 G1,67) y S1 (AN3,34 H0 G1,67).

El menor nivel de glicerol utilizado (S4 y S5), generó un espectro con la banda entre 3100 y 3500 cm^{-1} de menor intensidad, debido a la menor cantidad de grupos hidroxilo capaces de formar puentes de hidrógeno con el agua. Cabe destacar que las

formulaciones con menor contenido de plastificante (S4 y S5), resultaron con un contenido reducido en humedad (**Tabla 4.8**), lo cual produjo una disminución de la intensidad de la banda asociada a los puentes de hidrógeno. Para esos mismos sistemas, a su vez, se observó una banda reducida en torno a los 1650 cm^{-1} (**C**). El agregado de HPMC (S1 y S2) redujo la intensidad de dicha banda sugiriendo que las interacciones almidón - agua fueron sustituidas por interacciones almidón – HPMC.

En el caso del almidón acetilado (**Figura 4.22**), puede observarse una nueva banda a 1734 cm^{-1} **(G)**, correspondiente al grupo carbonilo (C=O) del éster acetato. Por otro lado, la banda asociada a la presencia de agua (1653 cm^{-1}) **(C)** disminuyó significativamente su intensidad en todos los sistemas acetilados, en comparación con las formulaciones análogas de los nativos (**Figura 4.21**), indicando la disminución de grupos -OH en la molécula de almidón (esterificación).

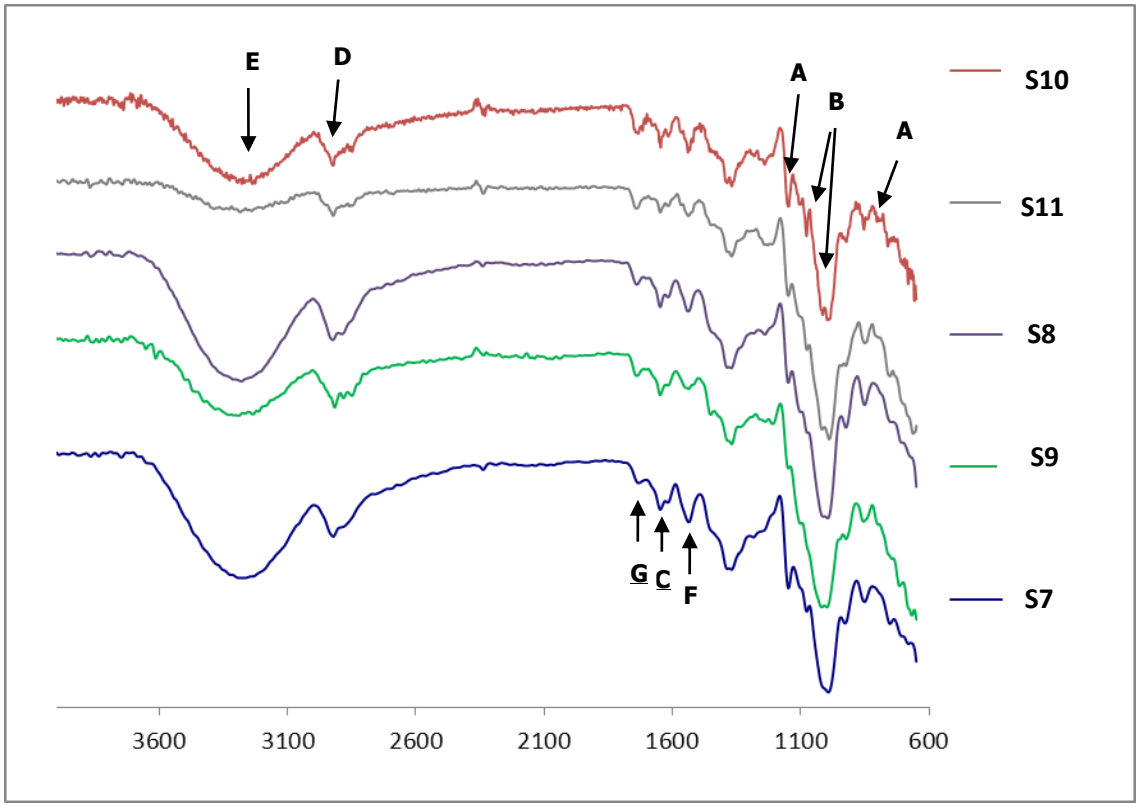

Figura 4.22. Espectro FTIR de películas elaboradas con almidón acetilado. Abreviaturas: S10 (AA3,34 H0 G0,85); S11 (AA2,67 H0,67 G0,85); S8 (AA2,67 H0,67 G1,67); S9 (AA2 H1,34 G1,67) y S7 (AA3,34 H0 G1,67).

El menor nivel de glicerol correspondiente a las formulaciones S10 y S11, determinó que la banda entre 3100 y 3500 cm^{-1} se redujera por la menor hidrofilicidad del sistema.

Puede apreciarse que, en el caso del almidón acetilado (**Figura 4.22**), la banda de absorción correspondiente a la formación de puentes de H intermoleculares se presenta a números de onda más bajos (3304, 3310, 3300 y 3308 cm^{-1} según la formulación) que en las películas nativas (3326, 3313, 3304 y 3360 cm^{-1}). Dicho corrimiento sugiere que existió una mayor tendencia a formar este tipo de enlaces en los sistemas acetilados.

4.2.11. Análisis mecánico dinámico (DMA)

A través del ensayo mecánico dinámico es posible evaluar los cambios en el desplazamiento o deformación del material, bajo la acción de una fuerza aplicada, como función del tiempo, la temperatura y la frecuencia. Esto permite describir el comportamiento macroscópico de los materiales causado por transiciones o transformaciones dentro de la microestructura de la matriz (Zhou y col., 2009). Esta técnica es de suma utilidad en el estudio de las propiedades viscoelásticas de biopolímeros como el almidón solo o sus mezclas con otros componentes (polímeros naturales o sintéticos, materiales de relleno, etc.) llegando a establecer condiciones de miscibilidad, compatibilidad o interacciones intermoleculares entre cadenas adyacentes de polímeros (López y col., 2014; Ma y col., 2009; Ma y col., 2008).

En las **Figuras 4.23** a **4.27** se muestran las curvas DMA de películas con 0,85% (p/p) de glicerol, a fin de analizar cambios en la movilidad molecular de la matriz biopolimérica frente a la temperatura, tales como transiciones vítreas (Tg) y, a su vez, posibles interacciones entre los componentes de las películas (almidón nativo o acetilado, HPMC y glicerol) a través del análisis de las curvas de módulo de almacenamiento, módulo de pérdida y tan δ (Liu y col., 2006).

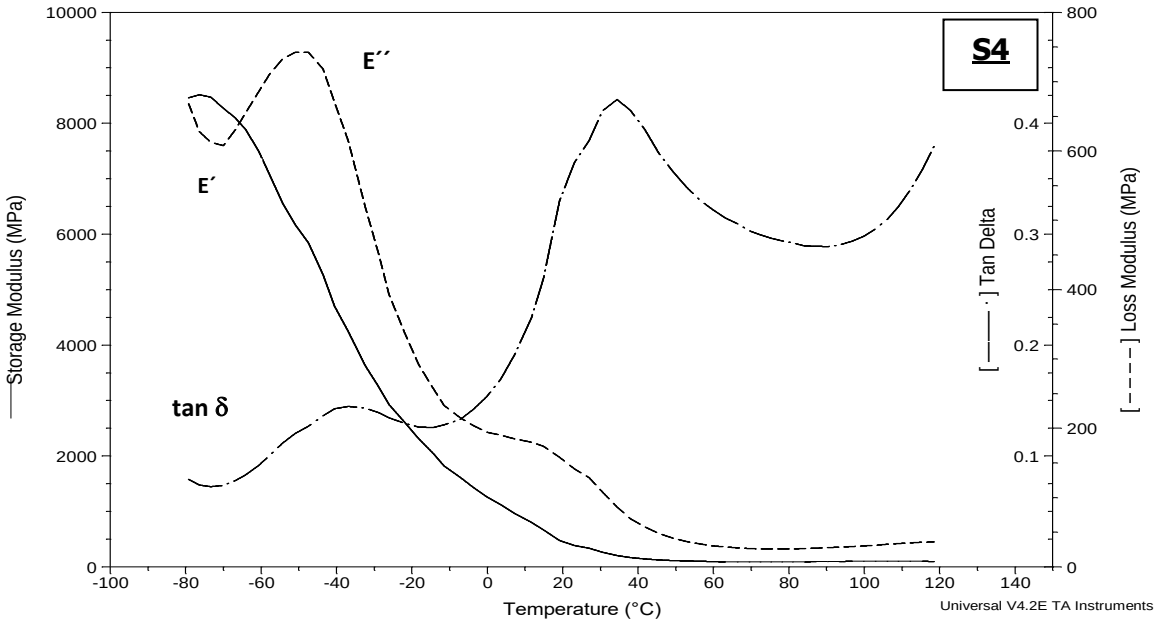

Figura 4.23. Espectro DMA de películas elaboradas con almidón nativo y glicerol (0,85 % (p/p)). Dependencia del módulo de almacenamiento (storage), módulo de pérdida (loss) y de la tangente del ángulo de desfasaje (tan δ) con la temperatura a una frecuencia de oscilación constante de 10 Hz.

En las películas elaboradas con almidón nativo y glicerol (**Figura 4.23**) se observa una caída del módulo de almacenamiento (E´) a medida que aumenta la temperatura, como resultado de la pérdida de rigidez de la matriz del biopolímero. En la zona de -37ºC, se observa un máximo en la curva de tan δ y, en la misma zona y, con mejor definición, un máximo del módulo de pérdida (E´´). Ha sido reportado que tan δ es altamente sensible a la movilidad molecular y que el máximo observado se relaciona con la temperatura de transición vítrea del material (Ma y col., 2008). En el caso de películas de almidón, se ha descripto dicha matriz como un compuesto de dos fases, una rica en almidón y pobre en plastificante y otra, rica en glicerol y pobre en almidón. De acuerdo al perfil de las curvas, la primera transición observada (máximo de tan δ a -37 ºC) correspondería a la Tg de la fase rica en glicerol (Tg_1). Estos resultados concuerdan con los reportados por otros autores para películas elaboradas con almidones y plastificadas con glicerol (Famá y col., 2006; López y col., 2011). De acuerdo a lo reportado en literatura (López y col., 2012), el segundo pico observado en la curva de tan δ, correspondería a la transición vítrea de la fase rica en almidón, la cual no fue tan claramente observada en la curva de E´. Posiblemente la pérdida de rigidez de la película, haya disminuido la señal registrada por el equipo a niveles muy

bajos, lo cual imposibilitó la detección de los distintos eventos a través de la dicha curva. El valor de esta Tg_2, medido en el máximo de tan δ fue de 34 ºC, el cual coincide, aproximadamente, con lo reportado para películas de almidón de mandioca plastificadas con glicerol (Tg_2: 38,1 ºC) por López y col. (2012).

Cabe señalar que las transiciones vítreas son bien detectadas en materiales puramente amorfos. En el caso de las películas estudiadas, se trata de sistemas esencialmente amorfos de acuerdo a lo determinado por difracción de Rx (**Item 4.1 – Figura 4.6**). En otros sistemas, como los semicristalinos, con zonas amorfas y otras ordenadas, distintas relajaciones de la matriz pueden ocurrir dentro de la fase amorfa y dentro de la fase cristalina. A su vez, dichas regiones amorfas y cristalinas están acopladas mecánicamente, es decir, no contribuyen independientemente al espectro de relajación observado (Bower, 2002), lo cual dificulta el análisis de estos materiales.

En la **Figura 4.24** se muestran los resultados para películas nativas con agregado de HPMC 0,67% (p/p).

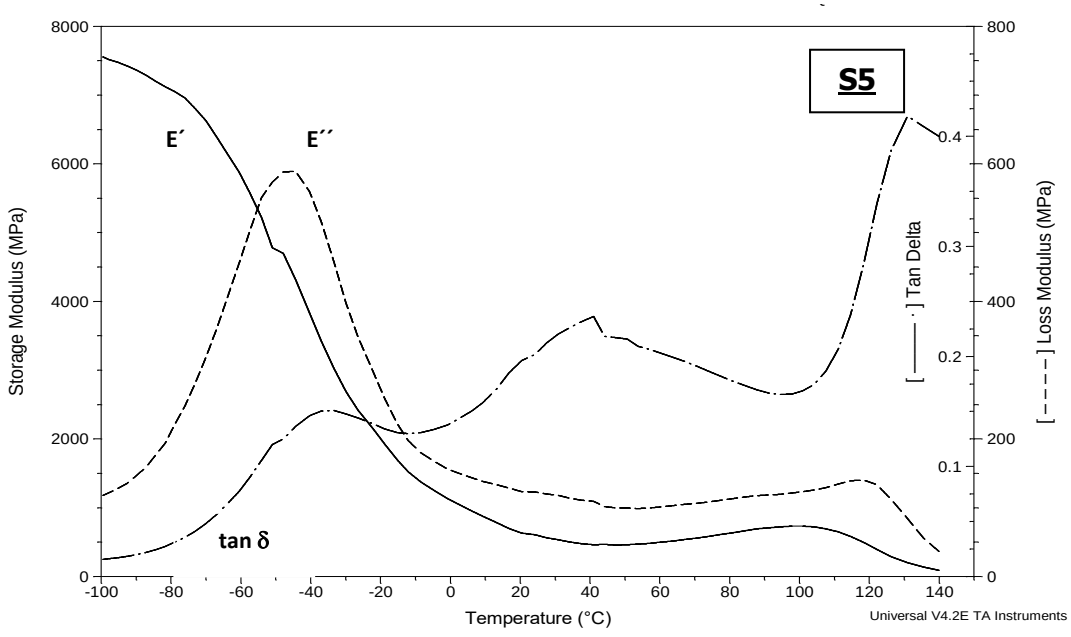

Figura 4.24. Espectro DMA de películas elaboradas con almidón nativo, HPMC 0,67% (p/p) y glicerol 0,85% (p/p). Dependencia del módulo de almacenamiento (storage), módulo de pérdida (loss) y de la tangente de del ángulo de desfasaje (tan δ) con la temperatura a una frecuencia de oscilación constante de 10 Hz.

En este caso se detectaron tres transiciones correspondientes a tres máximos observados en la curva de tan δ. Al igual que en las películas sin HPMC, se registraron las siguientes transiciones: una muy bien demarcada a baja temperatura (Tg_1: -33 ºC) correspondiente a la fase rica en glicerol, y otra a 41 ºC (Tg_2) asociada a la fase rica en almidón. La tercera relajación se registró a mayor temperatura, Tg_3: 131 ºC, la cual podría corresponder a una tercera fase rica en HPMC. De acuerdo con McPhillips y col. (1999) la Tg para películas elaboradas con HPMC se observó a ~162 ºC. A fines comparativos, se determinaron las relajaciones moleculares de películas elaboradoras con HPMC 3,34% (p/p) y glicerol 0,85% (p/p) (**Figura 4.25**).

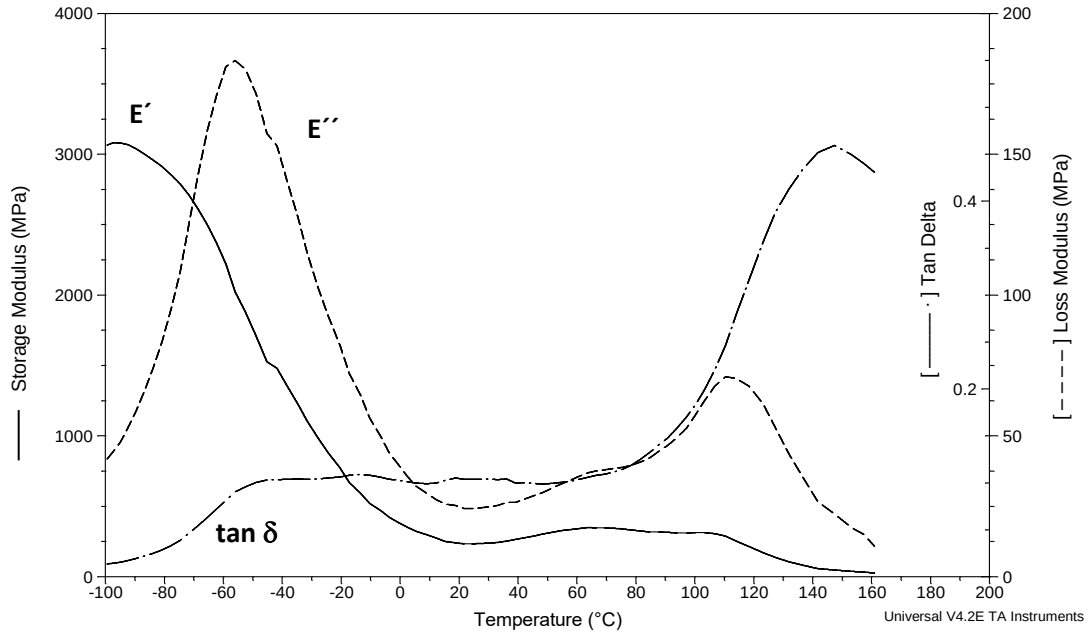

Figura 4.25. Espectro DMA de películas elaboradas con HPMC 3,34% (p/p) y glicerol 0,85% (p/p). Dependencia del módulo de almacenamiento (storage), módulo de pérdida (loss) y de la tangente de del ángulo de desfasaje (tan δ) con la temperatura a una frecuencia de oscilación constante de 10 Hz.

Puede apreciarse, nuevamente, un pico ancho de tan δ alrededor de -53 ºC (relajación Tg_1) que correspondería a la fase rica en glicerol. Aquí también se aprecia una muy buena definición del pico de E´´ a -56 ºC. Como esta temperatura es mucho menor que la registrada para almidón, se puede inferir que el glicerol es menos compatible con la goma que con el almidón, resultando una Tg_1 más cercana a la del plastificante, reportada alrededor de los -95 ºC (Famá y col., 2006). A mayor

temperatura aparece un nuevo máximo en la curva de tan δ (Tg_3: 147 ºC), posiblemente debido a una transición vítrea de la fase rica en HPMC. Este evento se manifestó también en las películas con almidón nativo con agregado de HPMC (**Figura 4.24**), lo cual refuerza nuestra hipótesis de que las películas elaboradas con mezcla de almidón y HPMC, constituyen sistemas heterogéneos con fases separadas, una rica en almidón y otra rica en HPMC, las cuales manifiestan su propia transición (Liu y col., 2006), además de la transición propia de una fase rica en glicerol.

La alta temperatura de la Tg_3 relacionada con la HPMC, revela que se trata de una fase con un muy reducido volumen libre en comparación con la fase rica en almidón, lo cual puede relacionarse con el menor espesor resultante en todas las películas con HPMC en su formulación (**ítem 4.2.3**).

En la **Figura 4.26** se aprecian los resultados para las películas obtenidas a partir de almidón acetilado con menor contenido de glicerol 0,85% (p/p).

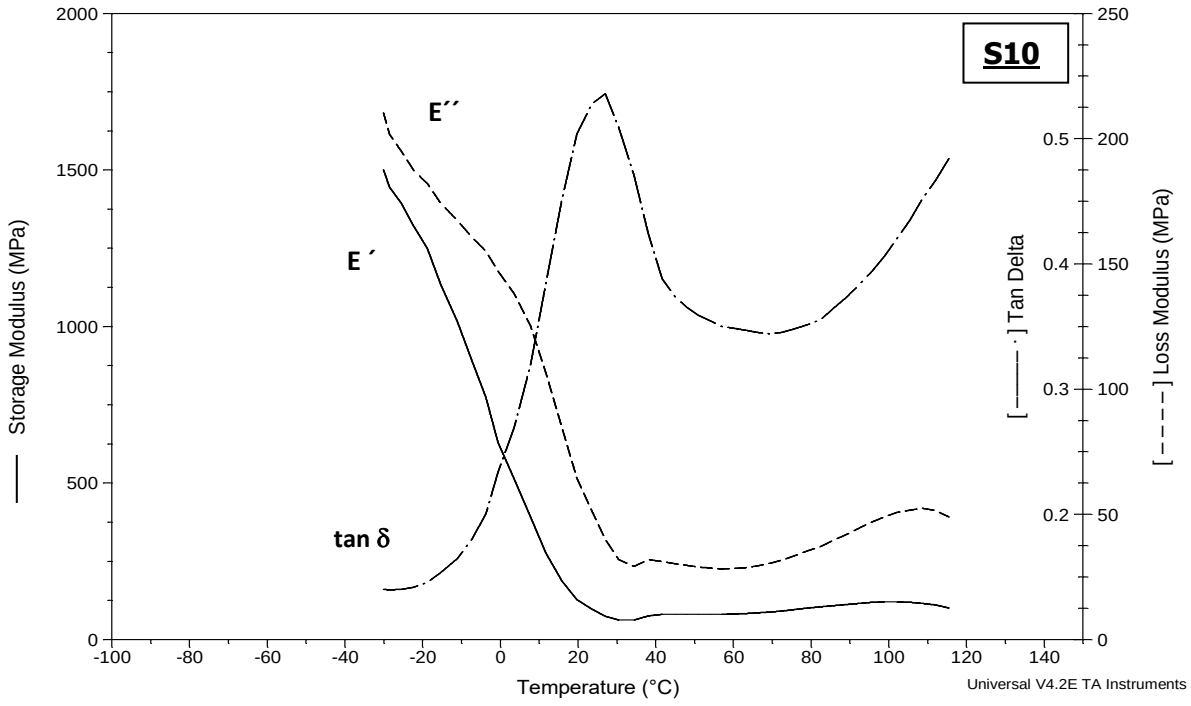

Figura 4.26. Espectro DMA de películas elaboradas con almidón acetilado 3,34% (p/p) y glicerol 0,85% (p/p). Dependencia del módulo de almacenamiento (storage), módulo de pérdida (loss) y de la tangente del ángulo de desfasaje (tan δ) con la temperatura a una frecuencia de oscilación constante de 10 Hz.

En este caso no fue posible realizar la corrida a partir de -100 ºC como en el resto de los sistemas, ya que se producía el quiebre de la probeta ante el primer movimiento de la mordaza. Por este motivo, no pudo observarse la transición vítrea de la fase rica en glicerol, la cual ocurriría a una temperatura menor a -40 ºC. Sin embargo, un máximo de tan δ pudo apreciarse a 27 ºC el cual está probablemente asociado a la Tg_2 de la fase rica en almidón acetilado.

Finalmente, se analizaron los perfiles DMA de películas de almidón acetilado con la incorporación de 0,67% (p/p) de HPMC y 0,85% (p/p) de glicerol (**Figura 4.27**).

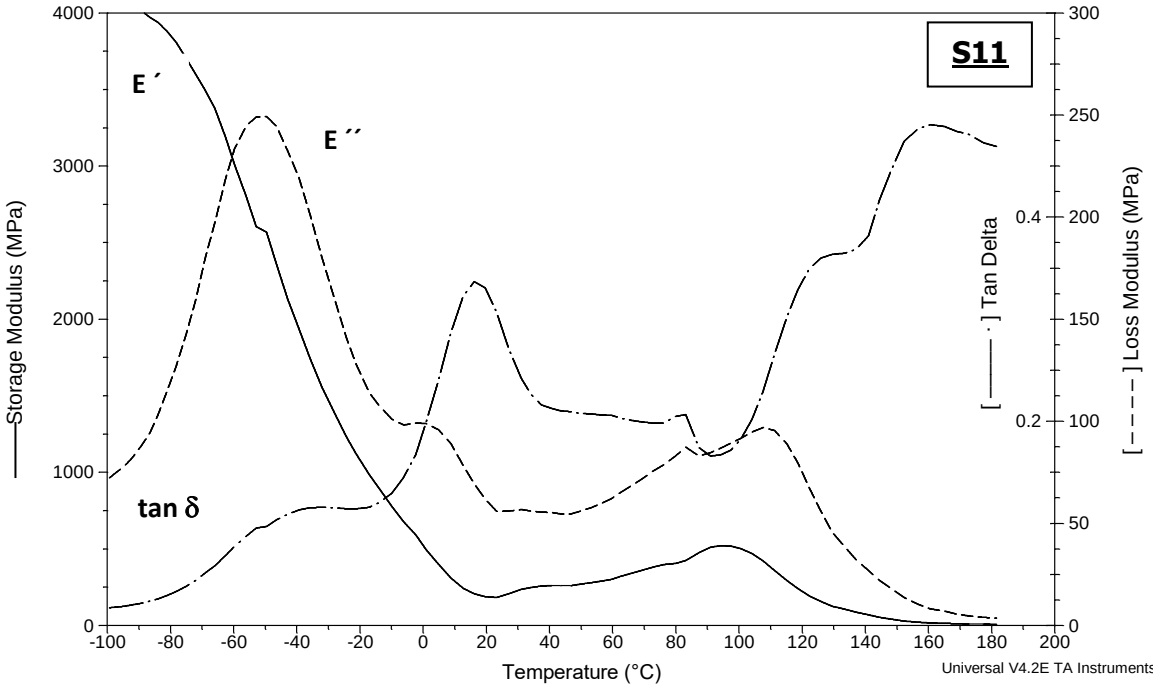

Figura 4.27. Espectro DMA de películas elaboradas con almidón acetilado, HPMC 0,67% (p/p) y glicerol 0,85% (p/p). Dependencia del módulo de almacenamiento (storage), módulo de pérdida (loss) y de la tangente del ángulo de desfasaje (tan δ) con la temperatura a una frecuencia de oscilación constante de 10 Hz.

En este caso, se observaron varios eventos en la curva de tan δ, en paralelo a máximos de E´´. El primero de ellos, Tg_1: -39 ºC (pico muy ancho), atribuido a la fase rica en glicerol. A continuación, un pico bien definido a Tg_2: 16 ºC, asociado a una relajación de la fase rica en almidón acetilado. A alta temperatura, se observaron dos eventos en tan δ ("Tg_3": 128 - 160 ºC), posiblemente asociados a relajaciones de la fase rica en HPMC. Cabe aclarar que los sistemas analizados son materiales con cierto contenido de humedad (**Tabla 4.8**), por lo que los eventos registrados a temperaturas

mayores a 50ºC pueden estar afectados por la deshidratación de la muestra (aumento de E´). A temperaturas aún mayores, es posible también que comiencen a ocurrir procesos de fusión de los distintos componentes de las películas. Estos fenómenos dificultan la correcta definición e interpretación de las curvas de DMA.

Para un mejor análisis, se muestra a continuación la **Tabla 4.11** donde se resumen las diferentes transiciones vítreas en base a los máximos de la curva de tan δ registrados.

Tabla 4.11. Valores de las transiciones vítreas observadas para los sistemas ensayados mediante DMA. (Tg1: fase rica en glicerol; Tg2: fase rica en almidón y Tg3: fase rica en HPMC).

Película	Tg_1 (°C)	Tg_2 (°C)	Tg_3 (°C)
S4 (AN3,34 H0 G0,85)	-37	34	N.R.
S5 (AN2,67 H0,67 G0,85)	-33	41	131
SISTEMA (H3,34 G0,85)	-53	N.R.	147
S10 (AA3,34 H0 G0,85)	N.D.	27	N.R.
S11 (AA2,67 H0,67 G0,85)	-39	16	128 - 160

N.R.: no registrado, N.D.: no determinado.

Al comparar las películas nativas con y sin HPMC (**Tabla 4.11**), puede inferirse que en presencia de la goma el pico de la Tg_1 de la fase rica en glicerol aumentó levemente (-37 ºC sin HPMC y -33 ºC con HPMC), al igual que la de la fase rica en almidón (Tg_2 34 ºC sin HPMC y 41 ºC con HPMC). Estos resultados sugieren el acercamiento entre cadenas de biopolímeros y, a su vez, una buena interacción entre ellas como entre ellas y el plastificante, reduciendo el volumen libre y por lo tanto la movilidad molecular (Ma y col., 2008). La fase rica en HPMC, desplazó su máximo de tan δ a una menor temperatura (Tg_3: 131 ºC) respecto al observado en la película

constituida exclusivamente con HPMC (147 ºC) indicando una mayor movilidad para esta fase en presencia de almidón.

En el caso de las películas acetiladas con o sin el agregado de HPMC, se observó que el máximo de tan δ de la fase rica en almidón se desplazaba a temperaturas menores en presencia de la goma (Tg_2 27 ºC sin HPMC y 16 ºC con HPMC). En este caso, la mezcla de estos biopolímeros produjo una matriz de mayor movilidad y mayor volumen libre, posiblemente como consecuencia de la modificación en las cadenas de almidón introducidas por la esterificación del mismo, la cual interferiría en las interacciones almidón-almidón y almidón-HPMC. Respecto de la fase rica en HPMC, se observaron dos eventos: uno a menor temperatura (Tg_3: 128 ºC) que el observado en la película de HPMC (147 ºC), y otro a mayor temperatura (160 ºC). La zona de la curva, a altas temperaturas, es compleja por la superposición de eventos como deshidratación del sistema y fusiones, que podrían manifestarse.

Al comparar el uso de los diferentes almidones, se observa en la **Tabla 4.11** que la fase rica en almidón modificado presentó una importante reducción en la temperatura de relajación (27 ºC) con respecto al almidón nativo (34 ºC), indicando que la modificación química realizada generó una fase biopolimérica con una mayor movilidad molecular de sus cadenas mostrando una Tg_2 más cercana a la temperatura ambiente. La incorporación de grupos acetato, que funcionarían a modo de ramificaciones, incrementarían el volumen libre de esta fase.

En presencia de HPMC, la relajación de la fase rica en glicerol ocurrió a menor temperatura en el caso del almidón acetilado (Tg_1: -33 ºC nativo y -39 ºC acetilado). Esto indica una fase rica en plastificante de mayor movilidad en el caso del almidón acetilado. A su vez, el sistema de almidón acetilado y HPMC mostró una Tg_2 a 16ºC, siendo más baja que la correspondiente al nativo (Tg_2: 41 ºC). Nuevamente, este resultado es indicativo de la obtención de una matriz de mayor volumen libre y por lo tanto de incrementada movilidad en el caso de la mezcla almidón acetilado-HPMC. La introducción de grupos acetato, podría ser responsable de este efecto. Para la transición de la fase rica en HPMC, se observó un evento a similar temperatura tanto para el sistema con almidón nativo (131 ºC) como para el de almidón acetilado (128 ºC), que corresponderían a una transición vítrea de la fase rica en HPMC. En el caso de las películas constituidas a base de almidón acetilado se suma, además, otro máximo de tan δ a 160 ºC, como se mencionó previamente.

4.3. Actividad antimicrobiana de películas comestibles elaboradas con almidón nativo/HPMC o acetilado/HPMC y conteniendo sorbato de potasio

A fin de completar la caracterización de las películas, se analizaron las propiedades antimicrobianas. Para dicho estudio se seleccionó la formulación constituida por almidón nativo o acetilado 2,67%, HPMC 0,67% y glicerol 1,67% (p/p) (Sistemas S2 y S8, respectivamente). Priorizando algunas propiedades, se seleccionaron estos dos sistemas por presentar valores intermedios de las propiedades mecánicas, PVA y solubilidad.

4.3.1. Ensayo de difusión en ágar

En la **Tabla 4.12** se observan los resultados del ensayo de halo frente a la levadura *Z. bailii*. Se observó que las películas control (sin KS) permitieron el crecimiento del microorganismo, incluso en la zona de contacto con el ágar. En tanto el sistema con KS, mostró inhibición del crecimiento en la zona de contacto. Resultados similares fueron obtenidos para las películas a base de almidón acetilado.

Tabla 4.12. Ensayo de difusión en ágar de películas formuladas con KS frente a la levadura *Z. bailii*.

ALMIDÓN	SISTEMA	HALO	ZONA DE CONTACTO
NATIVO	**Control**	No	Crecimiento
	KS	No	Crecimiento Leve
ACETILADO	**Control**	No	Crecimiento
	KS	No	Sin Crecimiento

Estos resultados indicaron que el KS fue capaz de difundir a la zona de contacto con el ágar, disminuyendo el crecimiento de la levadura y, por lo tanto, ejerciendo su acción antimicrobiana. Sin embargo, no se registraron halos de inhibición,

posiblemente debido a que la cantidad de antimicrobiano contenida en el disco, no fue suficiente para evitar el crecimiento en forma total en la zona de contacto y para formar un halo alrededor del disco de película, en las condiciones ensayadas en el presente trabajo. De acuerdo a Flores (2006), el KS difunde rápidamente desde la matriz de películas elaboradas con almidón de mandioca y hacia el entorno.

4.3.2. Ensayo de barrera antimicrobiana

En la **Figura 4.28** se observan los resultados para el ensayo de barrera de las películas control y conteniendo KS frente a *Z. bailii*.

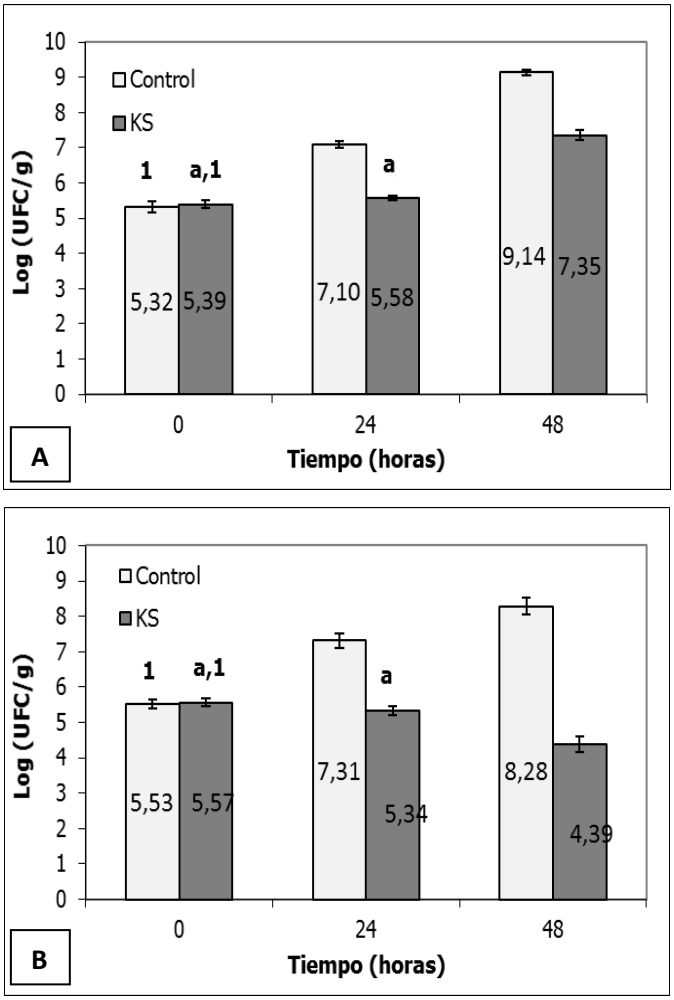

Figura 4.28. Desempeño como barrera a la contaminación externa de *Z. bailii* de películas elaboradas con A) almidón nativo y B) almidón acetilado. Sistemas Control (sin sorbato de potasio) y KS 0,3% (p/p) de sorbato de potasio. UFC/g: unidades formadoras de colonias por gramo de película. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas (p>0,05) para un mismo sistema durante el almacenamiento. Números iguales indican ausencia de diferencias significativas en cada panel y para un mismo tiempo (p>0,05).

En los sistemas controles (nativo o acetilado), el resultado fue el esperado, ya que estos no ejercieron efecto de barrera frente a la contaminación externa de levadura, y permitieron su crecimiento, incrementando el recuento entre 3,8 (nativo) y 2,7 (acetilado) ciclos log transcurridas 48 h de ensayo. Las películas que contenían KS, para ambos tipos de almidones, mantuvieron sin cambios significativos ($p>0,05$) la población del microorganismo, desde el inicio del ensayo (tiempo cero) y hasta las 24 h de almacenamiento. Cabe señalar que, en las películas de almidón nativo, se registró un incremento en la población de *Z. bailii*, de 1,96 ciclos log a las 48 h de ensayo, alcanzando un recuento de $2,2x10^7$ UFC/g el cual fue un ciclo log inferior al control luego de 48 h. Sin embargo, en el sistema acetilado, se registró un descenso de un ciclo log en el recuento de la levadura a las 48 h ($2,2x10^4$ UFC/g) respecto al tiempo 24h. Dicho recuento estuvo por debajo (~4 ciclos log) del registrado para el sistema control acetilado y 3 ciclos log inferior al recuento para el sistema con KS y almidón nativo, a igual tiempo de almacenamiento. Estos resultados muestran que el KS contenido en la película, estuvo disponible para actuar como agente antimicrobiano, independientemente del tipo de almidón utilizado. En el caso del almidón acetilado, se observó un mayor efecto antimicrobiano en comparación con el almidón nativo, posiblemente como resultado de una mayor biodisponibilidad del KS en el almidón acetilado potencialmente ligada a la mayor solubilidad (**ítem 4.2.6**). Por otro lado, una superficie más hidrofílica y, por lo tanto, de incrementada humectabilidad, de las películas acetiladas, determinada a través de los valores del ángulo de contacto (**ítem 4.2.9**; (14 ± 2)º para acetilado y (28 ± 1)º para nativo), podría facilitar la interacción de la levadura en superficie con el antimicrobiano. Se ha reportado que el KS incorporado a películas elaboradas con almidón de mandioca y glicerol, presentó un efecto bacteriostático en cuanto al crecimiento de *Z. bailii* testeado a través de un ensayo de barrera a la contaminación externa por dicha levadura (Flores y col. 2007b).

A fin de incrementar la acción antimicrobiana, se prosiguió con esta investigación incorporando otro agente, el carvacrol, con el objeto de evaluar su aporte a la actividad preservadora de las películas. A su vez, como es de esperar que las propiedades físicas de las matrices biopoliméricas se alteren por la incorporación de un nuevo componente, se evaluaron algunas de estas propiedades en películas conteniendo KS y carvacrol de manera conjunta.

4.4. Actividad antimicrobiana de películas comestibles elaboradas con almidón nativo/HPMC o acetilado/HPMC y conteniendo sorbato de potasio y carvacrol

Dado el reconocido accionar del carvacrol como agente antifúngico y antibacteriano (Chavan y Tupe, 2014; Kurek y col, 2013), se amplió el estudio de la actividad antimicrobiana de las películas conteniendo KS 0,3 % (p/p) y KS 0,3 % (p/p)/carvacrol 0,2 % (p/p) o 0,5% (p/p), utilizando como microorganismos de evaluación a la levadura *Z. bailii,* y a las bacterias *Lactobacillus plantarum y Pseudomonas fluorescens.*

4.4.1. Ensayo de difusión en ágar

En las **Tabla 4.13** y **4.14** se observan los resultados del ensayo del halo para películas elaboradas con almidón nativo y acetilado y, adicionadas con 0,2 y 0,5 % (p/p) de carvacrol.

Tabla 4.13. Ensayo de difusión en ágar de películas elaboradas a partir de almidón nativo con KS y, adicionadas con 0,2 y 0,5 % (p/p) de carvacrol.

SISTEMA	HALO	ZONA DE CONTACTO		
		Z. bailii	***L. plantarum***	***P. fluorescens***
Control	No	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento
KS	No	Crecimiento Leve	Crecimiento	Crecimiento
KS - 0,2% (p/p) carvacrol	No	Crecimiento Leve	Crecimiento Leve	Crecimiento Leve
KS - 0,5% (p/p) carvacrol	No	Sin Crecimiento	Sin Crecimiento	Sin Crecimiento

Tabla 4.14. Ensayo de difusión en ágar de películas elaboradas a partir de almidón acetilado con KS y, adicionadas con 0,5 % (p/p) de carvacrol.

SISTEMA	HALO	ZONA DE CONTACTO		
		Z. bailii	***L. plantarum***	***P. fluorescens***
Control	No	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento
KS	No	Crecimiento Leve	Crecimiento	Crecimiento
KS - 0,5% (p/p)) carvacrol	No	Sin Crecimiento	Sin Crecimiento	Sin Crecimiento

Se observó que los sistemas Controles (nativo o acetilado) permitieron el crecimiento de los microorganismos, puesto que no poseían en su formulación ningún agente antimicrobiano. Los sistemas con KS no ejercieron efecto inhibitorio considerable, salvo para la levadura *Z. bailii* debido a su acción antifúngica. La incorporación de carvacrol a la formulación con almidón nativo mejoró la efectividad de las películas evaluadas, ya que se observó una disminución del crecimiento en el caso de contener 0,2% (p/p) de carvacrol y ausencia de crecimiento en el caso del agregado de 0,5% (p/p), tanto para la levadura como para las bacterias. En el caso del almidon acetilado (**Tabla 4.14**) se observa que la inclusión de 0,5% (p/p) de carvacrol también produjo ausencia de crecimiento de las bacterias y la levadura evaluadas.

Las **Figuras 4.29** a **4.31** muestran las imágenes del ensayo de difusión, para sistemas con almidón nativo. Similares resultados fueron observados para películas obtenidas a partir de almidón acetilado.

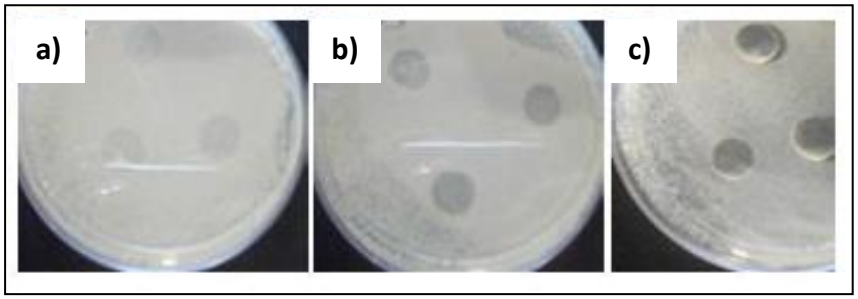

Figura 4.29. Zonas de inhibición para películas elaboradas con almidón nativo frente a *Z. bailii:* a) control (sin KS), b) 0,3% (/p)) de KS y c) 0,3% (p/p) de KS y 0,5% (p/p) de carvacrol.

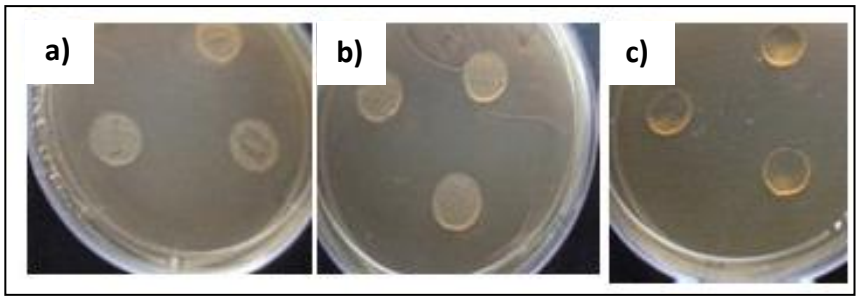

Figura 4.30. Zonas de inhibición para películas elaboradas con almidón nativo frente a *L. plantarum*: a) control (sin KS), b) 0,3% (p/p) de KS y c) 0,3% (p/p) de KS y 0,5% (p/p) de carvacrol.

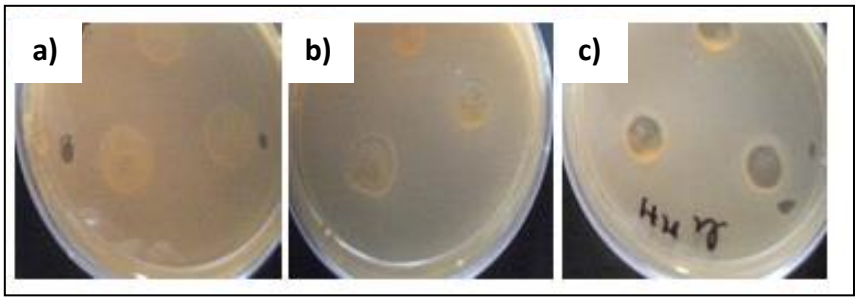

Figura 4.31. Zonas de inhibición para películas elaboradas con almidón nativo frente a *P. fluorescens*: a) control (sin KS), b) 0,3% (p/p) de KS y c) 0,3% (p/p) de KS y 0,5% (p/p) de carvacrol.

Se ha reportado que el carvacrol soportado en películas de almidón de mandioca en concentraciones de 0,01 a 1,0% (p/p), presenta una muy buena capacidad inhibitoria frente a *Z. bailii*, de acuerdo al ensayo de zona de inhibición y que el incremento de la cantidad de carvacrol en las películas, aumentó el tamaño de los halos observados (Miramont, 2012). Manohar y col. (2001) atribuyeron la actividad protectora del carvacrol frente a *Candida albicans,* a la inhibición de la formación de los tubos germinales necesarios para el desarrollo del micelio de la levadura. Por otro lado, Rojas-Grau y col. (2006) trabajaron con películas de puré de manzana con aceite esencial de orégano 0-0,1% (p/p) y probaron la actividad antimicrobiana contra *E. coli* O157:H7. Estos autores informaron zonas de inhibición de 1,4 mm con la máxima concentración ensayada del aceite esencial justificando estos resultados por las características de estructura de la pared celular y de la composición de la membrana de las bacterias Gram negativas, que condicionan la interacción con los aceites esenciales de naturaleza lipofílica.

4.4.2. Ensayo de barrera antimicrobiana

En las **Figuras 4.32** a **4.34**, se resumen los resultados para el ensayo de barrera tanto para las películas de almidón nativo como acetilado, frente a los tres microorganismos evaluados.

Como se señaló anteriormente, los sistemas controles constituidos por almidón nativo o acetilado, permitieron el crecimiento de la levadura mientras que las películas con KS inhibieron parcialmente su desarrollo. El agregado de 0,2% (p/p) de carvacrol no introdujo una mejora significativa en comparación con los sistemas conteniendo KS solamente (**Figura 4.32A**) en las películas elaboradas con almidón nativo. La incorporación de 0,5% (p/p) de carvacrol produjo la inhibición de *Z. bailii* desde el inicio del ensayo, reduciendo el recuento a menos de 100 UFC /g de película a partir de las 24 h de almacenamiento en el caso de las películas de almidón nativo.

Considerando el leve efecto mencionado para la concentración de 0,2% (p/p) de carvacrol, se decidió continuar los ensayos microbiológicos de barrera en las películas acetiladas únicamente con la mayor concentración de este antimicrobiano 0,5% (p/p).

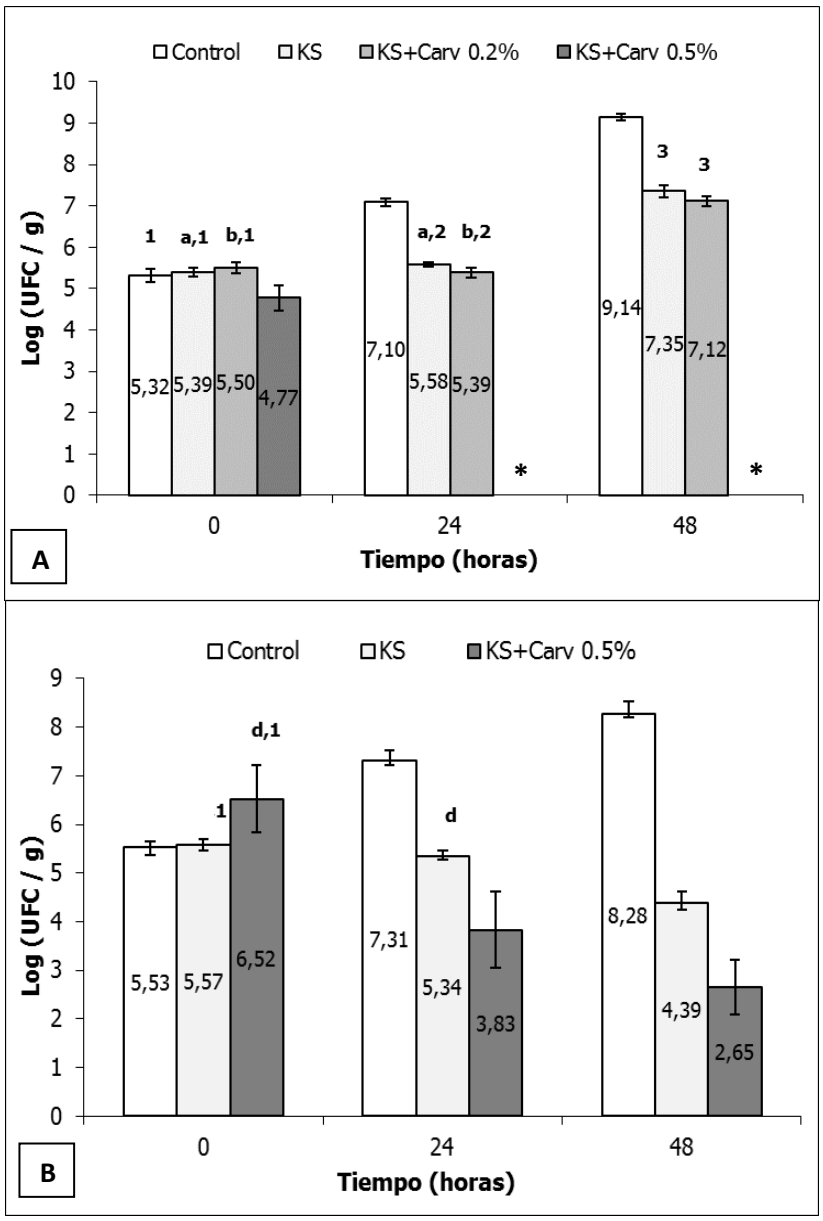

Figura 4.32. Desempeño como barrera a la contaminación externa de *Z. bailii* de películas elaboradas con A) almidón nativo y B) almidón acetilado. UFC/g: unidades formadoras de colonias por gramo de película. *: indica recuento inferior a 100 UFC/g para el sistema KS+Carv 0,5% (p/p). Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas (p>0,05) para un mismo sistema durante el almacenamiento. Números iguales indican ausencia de diferencias significativas en cada panel y para un mismo tiempo (p>0,05).

En los sistemas acetilados con 0,5% (p/p) de carvacrol, el recuento se redujo en aproximadamente 2,7 ciclos log a las 24 h y en 3,9 ciclos los a las 48 h. Estos resultados indican que las películas con KS y 0,5% (p/p) de carvacrol fueron más efectivas contra *Z. bailii* que las películas sólo con KS (**Figura 4.32**) ya que redujeron

el crecimiento desde el inicio del ensayo. Los resultados de esta tesis coinciden con los reportados por Miramont (2012) para películas con almidón de mandioca conteniendo carvacrol, las cuales actuaron eficientemente como barrera a una contaminación externa de *Z. bailii* cuando la concentración de carvacrol fue mayor al 0,1% (p/p). Se ha postulado que la actividad fungicida del carvacrol y el timol está relacionada con la inhibición de la síntesis de ergosterol y la disrupción de la integridad de la membrana debido a la formación de canales que incrementan la permeabilidad de la misma, lo cual conlleva al escape de iones potasio y otros contenidos citoplasmáticos (Chavan y Tupe, 2014). Si bien la acción antimicrobiana de las películas acetiladas es muy buena, la disminución en la actividad del carvacrol observada, podría estar vinculada a una mayor interacción con esta matriz, o bien a características estructurales (distinto tamaño de gota del carvacrol, distribución del mismo, etc.), que provocarían la disminución de la disponibilidad de este antimicrobiano. Más investigaciones son necesarias para corroborar estas hipótesis.

En el caso de las películas nativas o acetiladas testeadas frente a *L. plantarum*, se observó que el recuento se mantuvo sin cambios significativos durante el tiempo de estudio para los sistemas control y KS (efecto bacteriostático) (**Figura 4.33**). Algunos autores han reportado que el KS no ejerce una acción antimicrobiana frente al género Lactobacillus, llegando incluso a ser metabolizado por algunas especies (Sofos, 2000; Vásconez y col., 2008). El agregado de 0,2% (p/p) de carvacrol no introdujo una mejora significativa en comparación con los sistemas conteniendo KS solamente en las películas elaboradas con almidón nativo. Por el contrario, la incorporación de 0,5% (p/p) de carvacrol a la formulación mostró un alto efecto inhibitorio a partir de las dos horas de almacenamiento, reduciendo el recuento a menos de 100 UFC/g (**Figura 4.33A**).

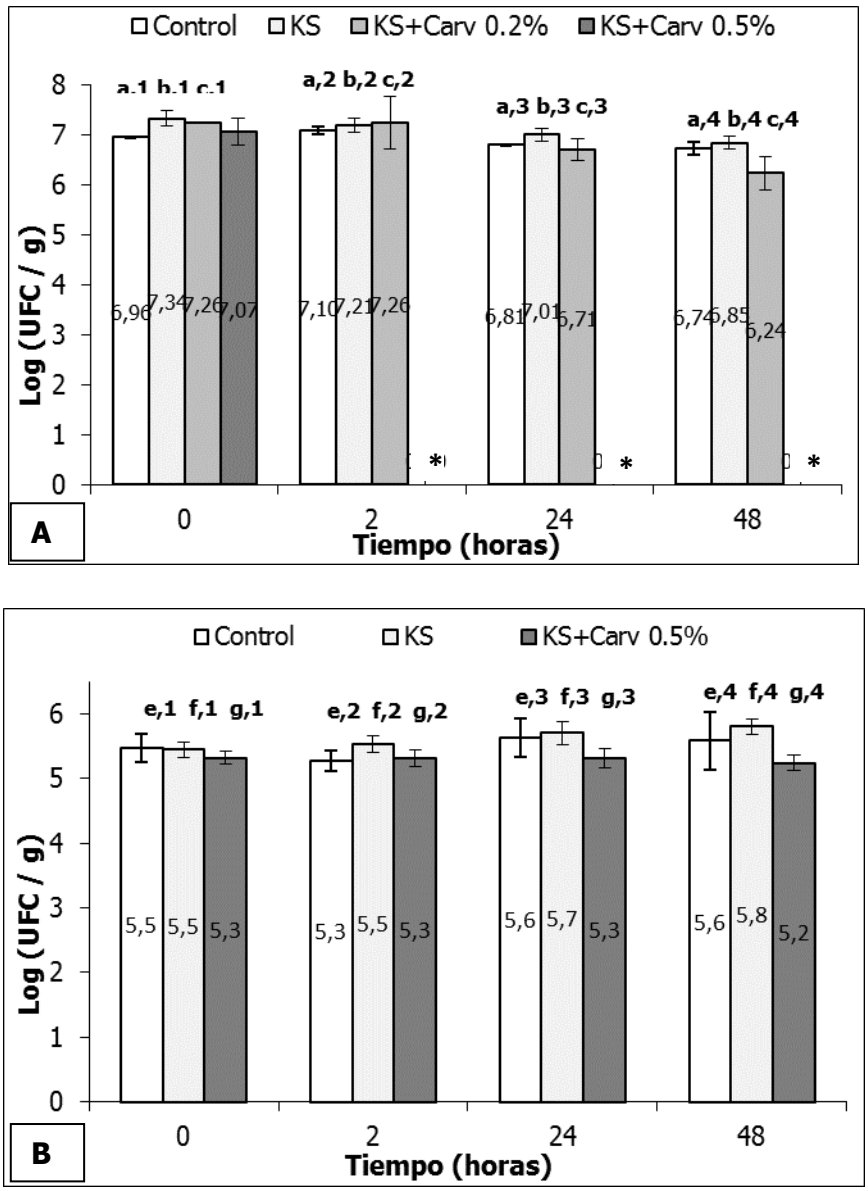

Figura 4.33. Desempeño como barrera a la contaminación externa de *L. plantarum* de películas elaboradas con A) almidón nativo y B) almidón acetilado. UFC/g: unidades formadoras de colonias por gramo de película. *: indica recuento inferior a 100 UFC/g para el sistema KS+Carv 0,5% (p/p). Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas (p>0,05) para un mismo sistema durante el almacenamiento. Números iguales indican ausencia de diferencias significativas en cada panel y para un mismo tiempo (p>0,05).

Considerando los resultados del sistema nativo con 0,2% (p/p) de carvacrol, se decidió continuar los ensayos microbiológicos de barrera en las películas acetiladas únicamente con la mayor concentración de este antimicrobiano. Cuando el ensayo se realizó utilizando películas de almidón acetilado conteniendo KS y 0,5% (p/p) carvacrol, se observó un efecto bacteriostático, similar al registrado para los sistemas control y

KS. En el caso de *L. plantarum* debe indicarse, además, que este género fue catalogado como menos sensible a la acción de los aceites esenciales que otros microorganismos Gram positivos. De acuerdo a Si y col. (2006), diferentes aislados mostraron una variada sensibilidad a los componentes de los aceites esenciales. Aislados de *L. plantarum,* a partir del intestino de cerdo, fueron más tolerantes que *L. acidophilus* a la acción del carvacrol *in vitro*, mostrando inhibición sólo a altas concentraciones del mismo. Esta resistencia del Lactobacilo, junto a una menor disponibilidad del antimicrobiano de acuerdo a lo dicho anteriormente, serían entonces las causas de la falta de inhibición observada en las películas acetiladas.

En el caso de *P. fluorescens* se observó que los sistemas control y KS presentan un comportamiento similar al descripto para el microorganismo anterior para películas nativas, es decir un efecto bacteriostático. La película KS-0,2% (p/p) Carv, tampoco inhibió el crecimiento de la bacteria durante el período estudiado, indicando una mayor tolerancia de este microorganismo a los factores de estrés ensayados. Por el contrario, la formulación KS-0,5% (p/p) Carv redujo el recuento prácticamente en su totalidad a partir de las dos horas (**Figura 4.34A**). Considerando los resultados del sistema nativo con 0,2% (p/p) de carvacrol, se decidió continuar los ensayos microbiológicos de barrera en las películas acetiladas únicamente con la mayor concentración de este antimicrobiano.

Las películas elaboradas a partir de almidón de mandioca acetilado y adicionadas con KS presentaron un efecto bacteriostático similar al control. El agregado de carvacrol, logró inhibir el crecimiento de este microorganismo a partir de las 24 horas (ausencia de recuento). Se observó así una capacidad antimicrobiana retrasada en el caso de las películas acetiladas en comparación con las nativas. El mecanismo antimicrobiano del carvacrol está basado en la perturbación de la membrana citoplasmática de la bacteria, con disrupción de la fuerza motriz de protones, el flujo de electrones, el transporte activo y la coagulación de los contenidos celulares. Además, el carvacrol es capaz de alterar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, resultando en la inhibición del crecimiento microbiano (Arrieta et al. 2014). La relación de la actividad antimicrobiana con la concentración de carvacrol contenida en películas con base en polisacáridos de manzana, fue evaluada por Du et al. (2008) detectando, a partir del ensayo de zona de inhibición, que en películas sin carvacrol, *E. coli* O157:H7 (bacteria Gram negativa) crecía normalmente

en ágar a 35°C. Por el contrario, no se observó crecimiento en el caso de películas que contenían 0,75 y 1,00 % de carvacrol.

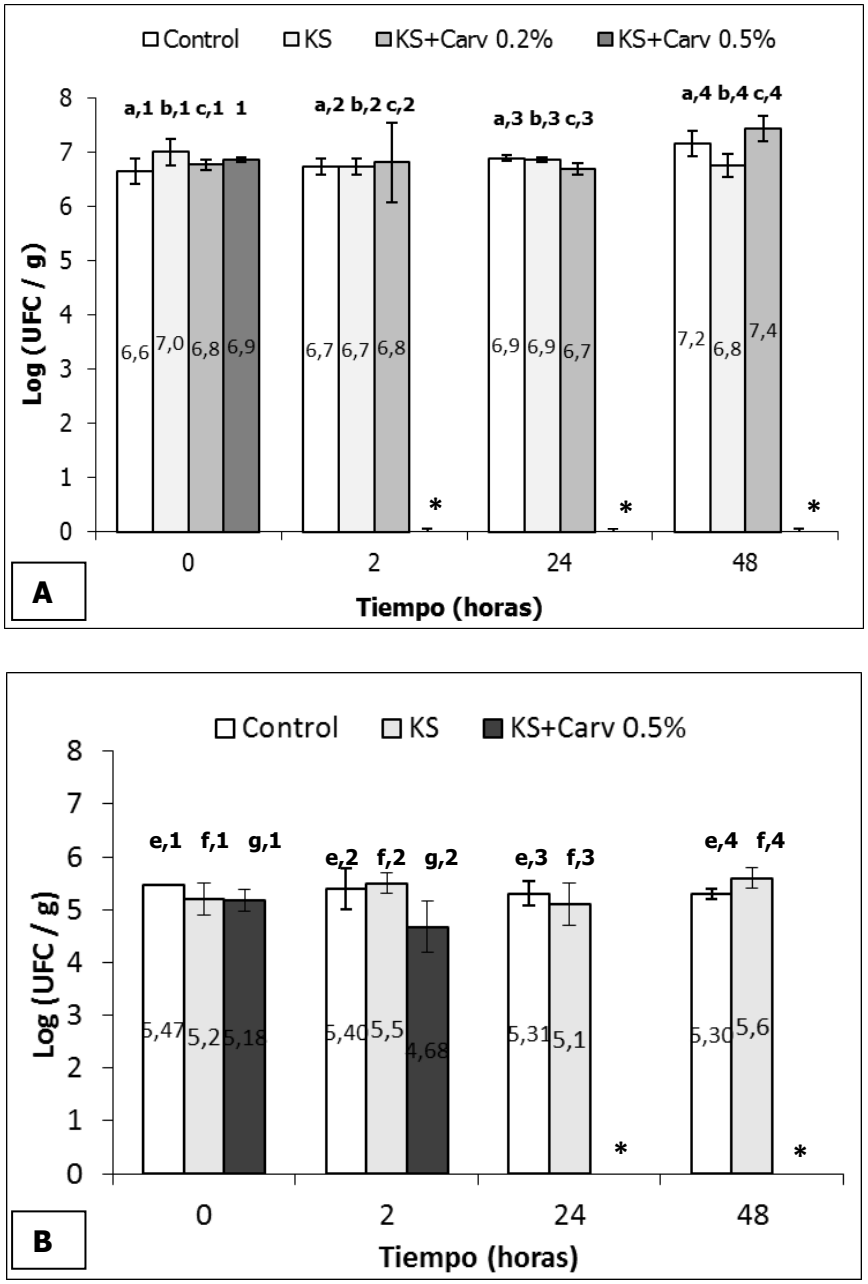

Figura 4.34. Desempeño como barrera a la contaminación externa de *P. fluorescens* de películas elaboradas con A) almidón nativo y B) almidón acetilado. UFC/g: unidades formadoras de colonias por gramo de película. *: indica recuento inferior a 100 UFC/g para el sistema KS+Carv 0,5%. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas (p>0,05) para un mismo sistema durante el almacenamiento. Números iguales indican ausencia de diferencias significativas en cada panel y para un mismo tiempo (p>0,05).

4.5. Caracterización de películas comestibles elaboradas con almidón nativo o acetilado y conteniendo sorbato de potasio y carvacrol

Es necesario considerar que la inclusión de carvacrol podría modificar las propiedades fisicoquímicas de las películas conteniendo sorbatos, por lo cual es necesario evaluar dichas propiedades para las nuevas formulaciones.

El efecto de la presencia de carvacrol 0,5% (p/p) en la PVA, color, solubilidad y las propiedades mecánicas de las películas, se muestra en la **Tabla 4.15.** Estos resultados se compararon con sistemas conteniendo KS solamente, tanto para las formulaciones a base de almidón nativo como acetilado.

Tabla 4.15. Propiedades fisicoquímicas de películas elaboradas con almidón de mandioca nativo o acetilado, HPMC y conteniendo KS o KS/carvacrol.

Sistemas / Caracterización		**NATIVO**		**ACETILADO**	
		KS 0,3% (p/p)	**KS + Carvacrol** 0,5% (p/p)	**KS** 0,3% (p/p)	**KS + Carvacrol** 0,5% (p/p)
Color	*L**	90,4 ± 0,3^{a}	90,7 ± 0,4^{a}	91,3 ± 0,3^{a}	90,5 ± 0,5^{a}
	*a**	-1,28 ± 0,06^{b}	-1,44 ± 0,03$^{b, c}$	-1,34 ± 0,06$^{b, c}$	-1,29 ± 0,04^{b}
	*b**	4,9 ± 0,3^{d}	4,6 ± 0,1^{d}	3,5 ± 0,2^{e}	3,2 ± 0,1^{e}
	YI	8,8 ± 0,6^{f}	8,2 ± 0,2^{f}	5,4 ± 0,5^{g}	5,4 ± 0,3^{g}
Propiedades Mecánicas	MY (MPa)	3,7 ± 0,7	1,7 ± 0,1	42 ± 5	15 ± 2
	σ_r (MPa)	1,2 ± 0,1	0,80 ± 0,03	3,0 ± 0,2	1,5 ± 0,1
	ε_r (%)	74 ± 7	54 ± 8^{h}	36 ± 3^{i}	43 ± 4^{h,i}
Solubilidad	(%)	38 ± 9 ^{j,k}	31 ± 3 ^{j}	43 ± 3 ^{k}	39 ± 5 $^{j, k}$
PVA x 10^{9}	g /Pa m s	1,07 ± 0,05^{l}	1,2 ± 0,1^{l}	1,06 ± 0,05^{l}	1,5 ± 0,5^{l}

Letras iguales en la misma fila indican ausencia de diferencias significativas (p>0,05).
MY (módulo de Young); ε_r (deformación); σ_r (esfuerzo a la ruptura).

El color de las películas nativas o acetiladas no se vio afectado por la incorporación de carvacrol. Du y col. (2008) informaron que el parámetro b* decrecía con el aumento de la concentración de carvacrol en películas constituídas en base a polisacáridos de manzana. En este estudio, se observó la misma tendencia en b* y YI, pero sin llegar a ser significativo.

Cabe mencionar que los sistemas acetilados mostraron valores de b* y YI más bajos ($p<0,05$) respecto de los nativos, indicando una menor tonalidad amarilla de estas películas, siguiendo la misma tendencia indicada en el **ítem 4.2.2**.

En cuanto a los parámetros mecánicos, se observó que la incorporación de carvacrol, en ambos tipos de películas (nativas o acetiladas), redujo la resistencia mecánica, ya que disminuyeron los valores del módulo de Young y del esfuerzo a la ruptura, en comparación con las formulaciones con KS solamente. Du y col. (2008) estudiaron las propiedades mecánicas de películas elaboradas a base de puré de manzana y conteniendo carvacrol en un rango de concentraciones de 0,5 a 1,5% (p/p). Estos autores reportaron que el incremento en la cantidad de carvacrol no producía cambios significativos en el esfuerzo a bajos niveles del preservador, mientras que para las mayores concentraciones observaron un descenso desde 1,9 a 1,6 MPa. En cuanto a la deformación porcentual a la ruptura, la misma mostró una tendencia no significativa a aumentar en presencia de carvacrol para el almidón acetilado. En el caso de las películas elaboradas con almidón nativo se observó una disminución de la deformación en la presencia de carvacrol. Cabe destacar, que las películas con carvacrol, fueron obtenidas a través de un proceso de emulsificación a fin de distribuir homogéneamente al componente principal del aceite esencial de orégano. Arrieta y col. (2013), reportaron que la presencia de carvacrol en la formulación de películas de caseinato de sodio o calcio y glicerol, mejoraron las propiedades dúctiles de esas matrices.

La **Tabla 4.15** también muestra que las películas nativas, con o sin agregado de carvacrol, fueron menos resistentes a la tracción que las acetiladas (menor MY y esfuerzo) pero presentaron mayor deformación, sin llegar a ser significativo este aumento en presencia del carvacrol.

En cuanto a la solubilidad, se observó una tendencia a disminuir cuando el carvacrol estaba presente en la formulación (nativo o acetilado), lo cual estaría determinado por su carácter hidrofóbico, sin embargo, dicha diferencia no resultó

estadísticamente significativa ($p>0,05$). Tampoco se observaron cambios significativos en la solubilidad por el uso de almidón nativo o acetilado.

Respecto a la PVA, en las películas de almidón acetilado, en general, no se observaron diferencias significativas entre todos los sistemas, siendo la PVA promedio para estos sistemas $(1,10\pm0,05) \times 10^{-9}$ g / Pa m s.

5. CONCLUSIONES GENERALES

De la síntesis de almidón acetilado y su caracterización:

- El almidón acetilado presentó propiedades distintivas respecto del nativo: gránulos erosionados y aglomeración, mayor retención de agua y solubilidad, menor cristalinidad y temperatura de gelatinización más baja.

De la fabricación de películas comestibles y su caracterización:

- La formulación y el tipo de modificación química efectuada sobre el almidón de mandioca, tuvieron importantes efectos en las propiedades mecánicas frente a la tracción, de superficie, de barrera, color y solubilidad de las películas desarrolladas.

- El color de las películas elaboradas tanto con almidón nativo como con almidón acetilado, se vio mayormente afectado por el agregado de HPMC, hidrocoloide que causó la disminución de los parámetros b* e YI de las mismas. A su vez, el uso de almidón acetilado modificó visiblemente el color de las películas, obteniéndose matrices más blancas y opacas debido a la presencia de agregados insolubles de partículas de almidón.

- En general, el glicerol y la HPMC ejercieron efectos contrarios en las propiedades mecánicas de las películas elaboradas con ambos almidones: un incremento de plastificante redujo el módulo elástico E y el esfuerzo y aumentó la deformación, mientras que la goma reforzó la matriz.

- El almidón modificado tendió a generar matrices más resistentes y menos deformables que el almidón nativo, debido fundamentalmente a la presencia de agregados que funcionarían como material de relleno (películas compuestas).

- La solubilidad aumentó, en general, con el aumento de HPMC, glicerol o con el uso de almidón acetilado. En este último caso, este resultado puede asociarse a la generación de una matriz menos compacta y, por ello con mayor susceptibilidad al agua.

- La permeabilidad al vapor de agua (PVA) descendió por el agregado de HPMC para películas constituidas con almidón nativo y 1,67% (p/p) de glicerol, ya que la presencia de fases separadas aumentó la tortuosidad de la matriz

disminuyendo la velocidad de difusión del vapor de agua. A su vez, la disminución del plastificante también disminuyó la permeabilidad. Las películas constituidas con almidón nativo presentaron interacciones significativas entre el contenido de HPMC y el de glicerol.

- Tanto el análisis de la microestructura como el mecánico dinámico, revelaron que la mezcla de biopolímeros produjo la obtención de matrices heterogéneas, con presencia de fases separadas.

De la evaluación de la actividad antimicrobiana de las películas comestibles conteniendo KS o KS/carvacrol:

- La adición de carvacrol mejoró notablemente la acción antimicrobiana de las películas frente a los tres microorganismos testeados, en especial cuando la matriz biopolimérica estaba constituida por almidón nativo.

- En el caso de las películas acetiladas, es necesario realizar más ensayos para establecer una relación entre su acción como barrera a la contaminación externa por microorganismos y las propiedades físicoquimicas de las películas, la cantidad de carvacrol contenida en ellas y las posibles interacciones con la matriz acetilada.

De la caracterización fisicoquímica de las películas comestibles conteniendo KS o KS/carvacrol:

- En general, se observó que las películas elaboradas con y sin carvacrol en una concentración del 0,5% (p/p) se constituyeron exitosamente con ambos almidones. Asimismo, no mostraron diferencias en cuanto al color, la solubilidad en agua y permeabilidad al vapor de agua.

- Respecto a las propiedades mecánicas, se pudo evidenciar que el módulo de Young y el esfuerzo a ruptura tanto de las películas elaboradas a partir de almidón nativo como acetilado de mandioca y adicionadas con carvacrol 0,5% (p/p), disminuyeron respecto de aquellas películas que no contenían el componente del aceite esencial de orégano.

- En cuanto a la deformación se observó que, no hubo diferencias significativas para este parámetro con y sin la adición del carvacrol 0,5% (p/p) en las películas elaboradas a partir de almidón acetilado; mientras que, para las

películas elaboradas a partir de almidón nativo, se observó que, al adicionar el carvacrol hubo una disminución significativa de la deformación.

Se puede concluir que:

Las películas desarrolladas en esta investigación, utilizando almidón nativo o acetilado de mandioca y conteniendo sorbato de potasio o sorbato de potasio / carvacrol, mostraron propiedades físico -químicas y microbiológicas adecuadas.

El agregado de 0,5% (p/p) de carvacrol junto con sorbato de potasio inhibió de manera eficaz el crecimiento de las bacterias *Lactobacillus plantarum* y *Pseudomonas* fluorescens y la levadura *Zygosaccharomyces bailii* provenientes de una contaminación en el proceso o una contaminación posterior.

Las películas desarrolladas presentan potencialidad para ser utilizadas como factor de estrés antimicrobiano o como material de empaquetamiento activo, contribuyendo a la preservación de la calidad e inocuidad de los alimentos.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Aguilera J, Stanley D. 1999. Microstructural principles of food processing and engineering. An Aspen Food Engineering Series Book. Second edition.

Al-Hassan A, Norziah MH. 2012. Starch-gelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. Food Hydrocolloids, 26: 108-117.

Anton de Salager R. 2005. Tensión interfacial. Cuaderno FIRP S203-A. Módulo de enseñanza en fenómenos interfaciales. Universidad de los Andes. Facultad de Ingeniería. Escuela de ingeniería química. 1-4.

Arismendi C, Chillo S, Conte A, Del Nobile M, Flores S, Gerschenson L. 2013. Optimization of physical properties of xanthan gum/tapioca starch edible matrices containing potassium sorbate and evaluation of its antimicrobial effectiveness. LWT - Food Science and Technology, 53: 290 – 296.

Arredondo Ochoa, T. 2012. Diseño de empaques comestibles activos a base de almidón modificado para su posible aplicación en alimentos en fresco. Tesis. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Química. Programa de Posgrado en alimentos del centro de la república (PROPAC). Páginas 1 -6.

Arrieta M, Peltzer M, López J, Garrigós M, Valentec A, Jiménez A. 2014. Functional properties of sodium and calcium caseinate antimicrobial active films containing carvacrol. Journal of Food Engineering, 121: 94–101.

Arrieta M, Peltzer M, Garrigós M, Jiménez A. 2013. Structure and mechanical properties of sodium and calcium caseinate edible active films with carvacrol. Journal of Food Engineering, 114: 486–494.

Atarés L, Bonilla J, Chiralt A. 2010. Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. Journal of Food Engineering, 100: 678–687.

Atarés L, De Jesús C, Talens P, Chiralt A. 2010. Characterization of SPI-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. Journal of Food Engineering, 99: 384–391.

Badwaik L, Borah PK, Deka S. 2014. Antimicrobial and enzymatic antibrowning film used as coating for bamboo shoot quality improvement. Carbohydrate Polymers, 103: 213–220.

Bartz J, Goebel J, Giovanaz M, Da Rosa Zavareze E, Artigas Schirmer M, Guerra Dias AR. 2015. Acetylation of barnyardgrass starch with acetic anhydride under iodine catalysis. Food Chemistry, 178: 236 – 242.

Barzegar H, Hossein Azizi M, Barzegar M, Hamidi-Esfahani Z. 2014. Effect of potassium sorbate on antimicrobial and physical properties of starch–clay nanocomposite films. Carbohydrate Polymers, 110: 26–31.

Basch C, Jagus R, Flores KS. 2013. Physical and antimicrobial properties of tapioca starch-HPMC edible films incorporated with nisin and/or potassium sorbate. Food and Bioprocess Technology, 6: 2419–2428.

Bastos D, Santosa A, Da Fonseca M, Simãoa R. 2013. Inducing surface hydrophobization on cornstarch film by SF6 and HMDSO plasma treatment. Carbohydrate Polymers, 91: 675– 681.

Bello-Pérez L, Agama-Acevedo E, Zamudio-Flores P, Mendez-Montealvo G, Rodriguez-Ambriz S. 2010. Effect of low and high acetylation degree in the morphological, physicochemical and structural characteristics of barley starch. LWT – Food Science and Technology, 43: 1434-1440.

Bello Pérez L, Contreras Ramos S, Jímenez Aparicio A, Paredes López O. 2000. Acetylation and characterization of banana (*musa paradisiaca*) starch. Acta Científica Venezolana, 51: 143–149.

Bertuzzi MA, Armada M, Gottifredi JC, Aparicio AR, Jiménez P. 2002. Estudio de la permeabilidad al vapor de agua de films comestibles para recubrir alimentos. Congreso Regional de Ciencia y Tecnología NOA. 1- 10.

Bertuzzi MA, Castro Vidaurre EF, Armada M, Gottifredi JC. 2007. Water vapor permeability of edible starch based films. Journal of Food Engineering, 80: 972–978.

Biswas A, Shogren RL, Selling G, Salch J, Willett JL, Buchanan C. 2008. Rapid and environmentally friendly preparation of starch esters. Carbohydrate Polymers, 74:137–141.

Bogner A, Jouneaua PH, Thollet G, Basset D, Gauthier C. 2007. A history of scanning electron microscopy developments: Towards "wet-STEM" imaging. Micron, 38: 390–401.

Bower D. 2002. An introduction to polymer physics. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Camino, Nerina Andrea. 2010. Comportamiento de hidroxipropil metilcelulosas y sus mezclas con ß-lactoglobulina en solución, interfases y emulsiones. Tesis Doctoral FCEN-UBA. Pag. 7-9.

Carmen A. Campos, Lía N. Gerschenson & Silvia K. Flores. 2011. Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. Food and Bioprocess Technology, 4: 849–875.

Campos C, Alzamora S, Gerschenson L. 2000. Inhibitory action of potassium sorbate degradation products against *Staphylococcus aureus* growth in laboratory media. International Journal of Food Microbiology, 54: 117–122. Short communication.

Carrillo L, Audisio MC. 2007. Manual de Microbiología de los Alimentos. San Salvador de Jujuy. 1-191.

Castillo L, López O, López C, Zaritzky N, García A, Barbosa S, Villar M. 2013. Thermoplastic starch films reinforced with talc nanoparticles. Carbohydrate Polymers, 95: 664– 674.

Chavan P, Tupe S. 2014. Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. Food Control, 46: 115 – 120.

Chillo S, Flores S, Mastromatteod M, Conte A, Gerschenson L, Del Nobile M. 2008. Influence of glycerol and chitosan on tapioca starch-based edible film properties. Journal of Food Engineering, 88: 159–168.

Chiumarelli M, Hubinger M. 2012. Stability, solubility, mechanical and barrier properties of cassavastarch - Carnauba wax edible coatings to preserve fresh-cut apples Food Hydrocolloids, 28: 59 – 67.

Chiumarelli M, Hubinger M. 2014. Evaluation of edible films and coatings formulated with cassava starch, glycerol, carnauba wax and stearic acid. Food Hydrocolloids, 38: 20 -27.

Colussi R, Pinto VZ, Mello SL, Levien Vaniera N, Villanova F, Silva R, Da Rosa Zavarezea A, Guerra Dias AR. Structural, morphological, and physicochemical properties o facetylated high-, medium-, and low-amylose rice starches. Carbohydrate Polymers, 103: 405– 413.

De Vriesa M, Vaughan E, Kleerebezem M, De Vos W. 2006. Lactobacillus plantarum—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. International Dairy Journal, 16: 1018–1028.

Du WX, Olsen CW, Avena-Bustillos R, Mchugh T, Levin C, Friedman M. 2008. Storage Stability and Antibacterial Activity against Escherichia coli O157:H7 of Carvacrol in Edible Apple Films Made by Two Different Casting Methods. J. Agric. Food Chem, 56: 3082–3088.

El Halal S, Colussi R, Zanella Pinto V, Bartz J, Radunz M, Lenin Villarreal Carreño N, Guerra Dias AR, Zavareze E. 2015. Structure, morphology and functionality of acetylated and oxidised barley starches. Food Chemistry, 168: 247–256.

Escobar D, Ospina D, Gómez AG, Restrepo-Parra E, Arango PJ. 2014. X-ray microstructural analysis of nanocrystalline TiZrN thin films by diffraction pattern modeling. Materials Characterization, 88: 119 – 126.

Espinel Villacrés R, Flores S, Gerschenson L. 2014. Biopolymeric antimicrobial films: Study of the influence of hydroxypropyl methylcellulose, tapioca starch and glycerol contents on physical properties Materials Science and Engineering C, 36: 108–117.

Falguera V, Quintero J, Jiménez A, Muñoz J, Ibarza A. 2011. Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. Trends in Food Science & Technology, 22: 292 – 303.

Famá L, Rojas AM, Goyanes S, Gerschenson L. 2005. Mechanical properties of tapioca-starch edible films containing sorbates. LWT, 38: 631–639.

Famá L, Flores SK, Gerschenson L, Goyanes S. 2006. Physical characterization of cassava starch biofilms with special reference to dynamic mechanical properties at low temperatures. Carbohydrate Polymers, 66: 8–15

Famá L, Goyanes S, Gerschenson L. 2007. Influence of storage time at room temperature on the physicochemical properties of cassava starch films. Carbohydrate Polymers, 70: 265–273.

Fanelli, B. (2009). Almidón. Universidad Nacional de Quilmes. Área Química de los Alimentos. Disponible en: http://psceni.blog.unq.edu.ar/modules/docmanager/view_file.php?curent_file=78&curent_dir=26

Farhan A, Mohd Hani N. 2017. Characterization of edible packagingfilms based on semi-refinedkappa-carrageenan plasticized with glycerol and sorbitol. Food Hydrocolloids, 64: 48 – 58.

Ferry, J. 1980. Viscoelastic properties of polymers. Tercera edición. Jhon Wilkey and sons. Inc. New York, USA. Páginas 33 – 94 y 156 – 167.

Fialova J, Chumchalova J, Mikova K, Hrusova I. 2008. Effect of food preservatives on the growth of spoilage lactobacilli isolated from mayonnaise-based sauces. Food Control, 19: 706–713.

Flores S, Costa D, Yamashita F, Gerschenson L, Grossman MV. 2010. Mixture design for evaluation of potassium sorbate and xanthan gum effect on properties of tapioca starch films obtained by extrusion. Materials Science and Engineering C, 30: 196–202.

Flores S, Fama L, Rojas A, Goyanes S, Gerschenson L. 2007a. Physical properties of tapioca-starch edible films: Influence of filmmaking and potassium sorbate. Food Research International 40: 257–265.

Flores S, Conte A, Campos C, Gerschenson L, Del Nobile M. 2007b. Mass transport properties of tapioca-based active edible films. Journal of Food Engineering, 81: 580–586.

S Flores, A S Haedo, C Campos, L Gerschenson. Antimicrobial performance of sorbates supported in a tapioca starch edible film (2007) European Food Research and Technology, 225 (3-4): 375-384.

Flores (2006) Tesis doctoral FCEN UBA. Desarrollo de recubrimientos y películas comestibles portadoras de antimicrobianos para aumentar la vida útil de alimentos.

Fujun Liu, Bing Q, Linghao H, Song R. 2009. Novel starch/chitosan blending membrane: antibacterial, permeable and mechanical properties. Carbohydrate Polymers 78: 146–150.

Ghasemlou M, Khodaiyan F, Oromiehie A, Yarmand M. 2011. Characterization of edible emulsified films with low affinity to water based on kefiran and oleic acid. International Journal of Biological Macromolecules, 49: 378– 384.

García-García RM, Palou-García E. 2008. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. Temas selectos de ingeniería de alimentos, 2 -2: 41 – 51.

Gerez CL, Torres MJ, Font de Valdez G, Rollán G. 2013. Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. Biological Control, 64: 231–237.

Gerschenson L, Rojas AM, Flores SK. Films & Coatings: Migration of ingredients. En Edible Films and Coatings: Fundamentals and Applications. Editores: Montero, MP; Gómez-Guillén; MC; López-Caballero, ME y Barbosa-Cánovas, GV. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida. Copyright 2016. ISBN: 978-1-48-221831-2.

Gómez García, C. 2012. Caracterización térmica y mecánica de polibutilentereftalato (pbt) reforzado con fibra de vidrio. Proyecto Fin de Período Formativo de Doctorado. Sección de postgrado y títulos propios. Universidad politécnica de cartagena. Cartagena, Colombia.

Han JH. Plastic films in food packaging. Materials, technology and applications. 2012. Chapter 10. Antimicrobial packaging systems. "PepsiCo Corporate Research, PepsiCo Inc., Plano, TX". 151 – 174.) Plastics design library. Edited by Sina Ebnesajjad. ELSEVIER.

Han F, Chunmei G, Mingzhu Liu, Feng H, Bing Z. 2013. Synthesis, optimization and characterization of acetylated corn starch with the high degree of substitution. International Journal of Biological Macromolecules, 59: 372– 376.

Han F, Mingzhu L, Honghong G, Shaoyu L, Boli N, Bing Z. 2012. Synthesis, characterization and functional properties of low substitutedacetylated corn starch. International Journal of Biological Macromolecules, 50: 1026– 1034.

Han F, Gao C, Liu M, Huang F, Zhang B. 2013. Synthesis, optimization and characterization of acetylated corn starch with the high degree of substitution. International Journal of Biological Macromolecules, 59: 372–376.

Higueras L, López-Carballo G, Gavara R, Hernández-Muñoz P. 2015. Incorporation of hydroxypropyl-β-cyclodextrins into chitosan films to tailor loading capacity for active aroma compound carvacrol. Food Hydrocolloids, 43: 603-611.

Homayouni H, Kavoosi G, Nassiri S. 2017. Physicochemical, antioxidant and antibacterial properties of dispersion made from tapioca and gelatinized tapioca starch incorporated with carvacrol. LWT – Food Science and Technology, 77: 503 – 509.

Huang J, Zhang P, Chen Z, Li H. 2010. Characterization of remaining granules of acetylated starch after chemical surface gelatinization. Carbohydrate Polymers, 80: 215–221.

Iturriaga L, Olabarrieta I, Martínez de Marañón I. 2012. Antimicrobial assays of natural extracts and their inhibitory effect against Listeria innocua and fish spoilage bacteria, after incorporation into biopolymer edible films. International Journal of Food Microbiology, 158: 58–64.

Jakobsen M, Narvhus J. 1996. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. ht. Dairy Journal, 6: 755-768. Review Article.

Jiménez A, Fabra MJ, Talens P, Chiralt A. 2012.Influence of hydroxypropylmethylcellulose addition and homogenization conditions on properties and ageing of corn starch based films. Carbohydrate Polymers, 89: 676– 686.

Jiménez A, Fabra MJ, Talens P, Chiralt A. 2010. Effect of lipid self-association on the microstructure and physical properties of hydroxypropyl-methylcellulose edible films containing fatty acids. Carbohydrate Polymers, 82: 585–593.

Han J. 2012. Innovations in food packaging. Primera edición. Academic press.

Kawai K, Fukami K, Yamamoto K. 2012. Effect of temperature on gelatinization and retrogradation in high hydrostatic pressure treatment of potato starch–water mixtures. Carbohydrate Polymers, 87: 314–321.

Kechichian V, Ditchfield C, Veiga-Santos P, Tadini C. 2010. Natural antimicrobial ingredients incorporated in biodegradable films based on cassava starch. LWT – Food Science and Technology, 43: 1088 - 1094.

Khalil Diop C, Long Li H, Xie B, Shi J. 2011. Effects of acetic acid/acetic anhydride ratios on the properties of corn starch acetates. Food Chemistry, 126: 1662–1669.

Khazaeia N, Esmaiilia M, Djomehb ZE, Ghasemlouc M, Jouki M. 2014. Characterization of new biodegradable edible film made from basil seed (*Ocimum basilicum L.*) gum. Carbohydrate Polymers, 102: 199–206.

Kralj I, Plavec J, Smole S, Zupancic-Kralj L. 2001. Characterization of sorbate geometrical isomers. Journal of Chromatography A, 905: 359–366. Short communication.

Krochta JM, Baldwin E, Nísperos-Carriedo MO. 1994. Edible films and coatings to improve food quality. Lancaster, PA: Technomic Publishing Co. Inc. páginas

Krochta JM, De Mulder-Johnston C. 1997. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. Food Technology, 51: 61-77.

Krochta JM. 2002. Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status and opportunities. En Protein-based films and coatings. Editor Gennadios A. Boca Raton, Florida, E.U., CRC Press, pp: 1-41.

Kumoro AC, Retnowati DS, Budivati CS. 2010. Microwave assisted synthesis and characterization of acetate derivative cassava starch. American Journal of food technology, 5: 100-110.

Kurek M, Moundanga S, Favier C, Galic K, Debeaufort F. 2013. Antimicrobial efficiency of carvacrol vapour related to mass partition coefficient when incorporated in chitosan based films aimed for active packaging. Food Control, 32: 168 - 175.

Laxmikant B., Borah P., Deka S. 2014. Antimicrobial and enzymatic antibrowning film used as coating for bamboo shoot quality improvement. Carbohydrate Polymers, 103: 213–220

Lebert I, Robles-Olvera V, Lebert A. 2000. Application of polynomial models to predict growth of mixed cultures of Pseudomonas spp. and Listeria in meat. International Journal of Food Microbiology, 61: 27–39.

Lewandowicz G, Fornal J, Walkowski A , Maczynski M, Urbaniak G , Szymanska G. 2000. Starch esters obtained by microwave radiation — structure and functionality. Industrial Crops and Products, 11: 249–257.

Li F. y Larock R. 2001. New soybean oil-styrene-divinylbenzene thermosetting copolymers. III.Tensile stress-strain behavior. Journal of Polymer Science. Part B: Polymer Physics, 39. 60-77.

Liu H, Yub L, Deanb K, Simon G, Petinakis E, Chen L. 2009. Starch gelatinization under pressure studied by high pressure DSC. Carbohydrate Polymers, 75: 395–400.

Liu Y, Bhandari B, Zhou W. 2006.Glass transition and enthalpy relaxation of amorphous food saccharides: a review. Journal of Agricole Food Chemistry, 54: 5701-5717.

Liu H., Ramsden L., y Corke H. 1999. Physical properties of cross-linked and acetylated normal and waxy rice starch. Starch/Stärke, 51: 249-252.

Lopez O, Garcia MA, Villar MA, Gentili A, Rodriguez MS. 2014.Thermo-compression of biodegradable thermoplastic corn starchfilms containing chitin and chitosan. LWT - Food Science and Technology, 57: 106-115.

López O, Zaritzky N, Grossmann M, García M. 2013. Acetylated and native corn starch blend films produced by blown extrusion. Journal of Food Engineering, 116: 286–297.

López O, García M. 2012. Starch films from a novel (Pachyrhizus ahipa) and conventional sources: Development and characterization. Materials Science and Engineering C, 32: 1931–1940.

López O, Lecot C, Zaritzky N, García M. 2011. Biodegradable packages development from starch based heat sealable films. Journal of Food Engineering, 105: 254–263.

Lopez O, Garcia M, Zaritzky N. 2008. Film forming capacity of chemically modified corn starches. Carbohydrate Polymers, 73: 573–581.

Luo Z y Shi Y. 2012. Preparation of Acetylated Waxy, Normal, and High-Amylose Maize Starches with Intermediate Degrees of Substitution in Aqueous Solution and Their Properties. J. Agric. Food Chem, 60: 9468−9475

Ma X, Chang P, Yu J, Wang N. 2008. Preparation and properties of biodegradable poly(propylene carbonate)/thermoplastic dried starch composites. Carbohydrate Polymers, 71: Issue 2, 229-234.

Ma X, Chang P, Yang J, Yu J. 2009. Preparation and properties of glycerol plasticized-pea starch/zinc oxide-starch bio nanocomposites. Carbohydrate Polymers, 75, Issue 3: 472-478.

Manohar V, Ingram C, Gray J, Talpur NA, Echard BW, Bagchi D, Preuss HG. 2001. Antifungal activities of origanum oil against Candida albicans. Molecular Cell Biochemistry, 228 (1-2):111- 117.

Maftoonazada N, Ramaswamy HS, Moalemiyan M, Kushalappa CA. 2007. Effect of pectin-based edible emulsion coating on changes in quality of avocado exposed to *Lasiodiplodia theobromae* infection. Carbohydrate Polymers, 68: 341–349.

Martínez VY. (2005). Alteraciones microestructurales y ultraestructurales de tejidos vegetales mínimamente procesados. Impacto en las características mecánicas. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.

Miramont, Sofia. 2012. Tesis de maestría en tecnología de los alimentos. Recubrimientos elaborados a partir de biopolímeros para el soporte de sustancias con

Mirmoghtadaie L, Kadivar M, Shahedi M. 2009. Effects of cross-linking and acetylation on oat starch properties. Food Chemistry, 116: 709–713.

Nutan M, Soliman M, Taha E, Khan M. 2005.Optimization and characterization of controlled release multi-particulate beads coated with starch acetate. International Journal of Pharmaceutics, 294: 89–101.

Ollé C, Jagus R, Gerschenson L. 2014a. Natamycin efficiency for controlling yeast growth in models systems and on cheese surfaces. Food Control, 35: 101 – 108.

Ollé C, Jagus R, Gerschenson L. 2014b. Effect of natamycin, nisin and glycerol on the physicochemical properties, roughness and hydrophobicity of tapioca starch edible films. Materials Science and Engineering C, 40: 281–287.

Ortega Toro R, Jiménez A, Talens P,Chiralt A. 2014.Properties of starch–hydroxypropyl methylcellulose based filmsobtained by compression molding. Carbohydrate Polymers, 109: 155–165.

Ozdemir M, Floros J. 2008. Optimization of edible whey protein films containing preservatives for water vapor permeability, water solubility and sensory characteristics. Journal of Food Engineering 86: 215–224.

Pagella C, Spigno G, De Faveri M. 2002. Characterization of starch based edible coatings. Institution of chemical engineer stransicheme, vol 80, part c.

Pasquel A. 2001. Gomas: una aproximación a la industria de alimentos. Revista Amazónica de Investigación Alimentaria, v.1, nº 1, p. 1 - 8.

Pastor J, Jawhari T, Merino J. 2003. Caracterización de materiales polímeros mediante la utilización de la micro espectroscopia vibracional (Raman, FTIR y FT-Raman). Revista Iberoamericana de polímeros. Volumen 4 (3).

Peressini D, Bravin B, Lapasin R, Rizzotti C, Sensidoni A. 2003. Starch–methylcellulose based edible films: rheological properties of film-forming dispersions. Journal of Food Engineering, 59: 25–32.

Pérez Espitia PJ., Du WX., Avena-Bustillos R., Ferreira Soares N., McHugh T. 2014. Edible films from pectine: Physical-mecanical and antimicrobial properties – A review. Food hydrocolloids, 35: 287-296.

Pérez PJ, Du WX, Avena-Bustillos R, Fátima N, McHugh T. 2014. Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties - A review. Food Hydrocolloids, 35: 287-296.

Ponce A, Roura S, Del Valle C, Moreira M. 2008. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: In vitro and in vivo studies. Postharvest Biology and Technology, 49: 294–300.

Prakash Marana J, Sivakumarb V, Sridharc R, Thirugnanasambandhamd K. 2013. Development of model for barrier and optical properties of tapioca starch based edible films. Carbohydrate Polymers, 92: 1335–1347.

Prieto-Mendez y col., 2010. J. Prieto-Méndez, C. L. Trejo-Cárdenas, F. Prieto-García M. A. Méndez-Marzo, L. A. Bello-Pérez y A. D. Román-Gutiérrez. Acetilación y caracterización del almidón de cebada. Revista Latinoamericana de Recursos Naturales, 6 (1): 32-43.

Quintavalla S, Vicini L. 2002. Antimicrobial food packaging in meat industry. Meat Science, 62: 373–380.

Rojas Grau MA, Avena Bustillos RJ, Friedman M, Henika PR, Martin Belloso O, McHugh TH. 2006. Mechanical, barrier and antimicrobial properties of apple puree edible films containing plant essentials. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 9262- 9267.

Rotta J, Ávila R, Kehrwald A, Mariz de Oliveira G, Días de Melo R, Manrique PL. 2009. Parameters of color, transparency, water solubility, wettability and surface free energy of chitosan/hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films plasticized with sorbitol. Materials Science and Engineering C, 29: 619–623.

Rungsinee Sothornvitand John M. Krocht. 2005. Plasticizers in edible films and coatings. Chapter 23. Innovations in Food Packaging. 403 – 428.

Sánchez-González L, González-Martínez C, Chiralt A, Cháfer M. 2010. Physical and antimicrobial properties of chitosan–tea tree essential oil composite films. Journal of Food Engineering, 98: 443–452.

Sanchez-Gonzalez L, Vargas M, Gonzalez-Martınez C, Chiral A, Chafer M. 2009. Characterization of edible films based on hydroxypropylmethylcellulose and tea tree essential oil. Food Hydrocolloids, 23: 2102–2109.

Sánchez-Rivera M, Rodriguez-Ambriz S, Gutierrez-Meráz F. 2013. Acetylation of banana (*Musa paradisiaca L.*) and corn (*Zea mays L.*) starches using a microwave heating procedure and iodine as catalyst: II. Rheological and structural studies. Carbohydrate Polymers, 92: 1256–1261.

Sánchez Rivera M, Flores Ramírez I, Zamudio Flores P, González Soto R, Rodríguez Ambriz S,Bello Perez LA. 2010.Acetylation of banana (*Musa paradisiaca L.*) and maize (Zea mays L.) starches using a microwave heating procedure and iodine as catalyst: Partial characterization. Starch, 62: 155–164.

Sandoval A, Nuñez M, Müller A, Della Valle G, Lourdin D. 2009. Glass transition temperatures of a ready to eat breakfast cereal formulation and its main components determined by DSC and DMTA. Carbohydrate Polymers 76: 528–534.

Serrano Martínez JL. 2012. Instrumentación y métodos de análisis químico. Espectroscopía infrarroja 1. Fundamentos. 1-35.

Si W, Gong J, Tsao R, Zhou T, Yu H, Poppe C, Johnson R, Du Z. 2006.Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards

selected pathogenic and beneficial gut bacteria. Journal of Applied Microbiology, 100: 296–305.

Singh J, Kaur L, McCarthy OJ. 2007. Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications—A review. Food Hydrocolloids, 21: 1–22.

Singh N, Chawla D, Singh J. 2004. Influence of acetic anhydride on physicochemical, morphological and thermbeal properties of corn and potato starch. Food Chemistry, 86: 601–608.

Sobral PJA, Menegalli FC, Hubinger MD, Roques MA. 2001. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. Food Hydrocolloids, 15: 423 – 432.

Sodhi N, Singh N. 2005. Characteristics of acetylated starches prepared using starches separated from different rice cultivars. Journal of Food Engineering, 70: 117–127.

Sofos, 2000. Sorbic acid. In A. S. Naidú (Ed.), Natural food antimicrobial systems. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Souza EL, Stamford TL, Lima EO, Trajano VN. 2007. Effectiveness of *Origanum vulgare L.* essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. Food Control, 18: 409–413.

Suriñach S, Baro MD, Bordas S, Clavaguera N, Clavaguera-Mora MT. 1992. La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la Ciencia de Materiales. Sociedad española de cerámicas y vidrios. 31: I, 11-17.

Tongdeesoontorn W., Mauer LJ., Wongruong S., Sriburi P., Rachtanapun P. 2011. Effect of carboxymethyl cellulose concentration on physical properties of biodegradable cassava starch-based films. Chemistry Central Journal, 1: 1186 – 1752.

Tripathi A, Tsavalas J, Sundberg D. 2013. Quantitative measurements of the extent of phase separation during and after polymerization in polymer composites using DSC. Thermochimica Acta, 568: 20–30.

Tunç S, Duman O. 2011. Preparation of active antimicrobial methyl cellulose/carvacrol/montmorillonite nanocomposite films and investigation of carvacrol release. LWT - Food Science and Technology, 44: 465 - 472.

Vásconez M, Flores S, Campos C, Alvarado J, Gerschenson L. 2009. Antimicrobial activity and physical properties of chitosan–tapioca starch based edible films and coatings. Food Research International, 42: 762–769.

Veldhuizen E, Tjeerdsma-van Bokhoven J, Zweijtzer C, Burt S, Haagsman. H. 2006. Structural Requirements for the Antimicrobial Activity of Carvacrol. Agric. Food Chemistry, 54: 1874-1879.

Ventura S, De Barros R, Sintra T, Soares C, Lima A, Coutinho J. 2012. Simple screening method to identify toxic/non-toxic ionic liquids: Ágar diffusion test adaptation. Ecotoxicology and Environmental Safety, 83: 55–62.

Vermeiren L, Devlieghere F, Van Beest M, Kruijf N, Debevere J. 1999. Developments in the active packaging of foods. Trends in food science and technology, 10: 77-86.

Vieira M, Da Silva MA, Dos Santos LO y Beppu MM. 2011. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. European Polymer Journal, 47 (3): 254–263.

Wikström F, Williams H, Verghese K, Clune S. 2014. The influence of packaging attributes on consumer behaviour in food-packaging life cycle assessment studies - a neglected topic. Journal of Cleaner Production, 73: 100-108.

Wu D, Sun DW. 2013. Colour measurements by computer vision for food quality control: A review. Trends in Food Science & Technology, 29: 5-20.

Zamudio Flores P, Bello Pérez LA. 2013. Elaboration and characterization of glycoprotein films obtained with the maillard's reaction using acetylated starch and whey protein isolated. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 12, 3: 401-413.

Zhou Y, Wang L, Li D, Yan P, Li Y, Shi J, Dong Chen X, Mao Z: 2009. Effect of sucrose on dynamic mechanical characteristics of maize and potato starch films. Carbohydrate Polymers, 76(2): 239-243.

ANEXO I

Resultados del ANOVA de dos factores (interacciones)

La tabla de ANOVA descompone la variabilidad de cada respuesta en contribuciones debidas a varios factores (contenido de glicerol y de HPMC). Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores y de la interacción entre ellos. Valores de P menores que 0,05, indican un efecto estadísticamente significativo sobre la respuesta con un 95,0% de nivel de confianza.

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

Películas elaboradas con almidón nativo

A) Color

Análisis de Varianza para L - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Gli	10,4049	1	10,4049	39,89	0,0000
B:HPMC	4,15828	2	2,07914	7,97	0,0010
INTERACCIONES					
AB	6,90571	2	3,45285	13,24	0,0000
RESIDUOS	12,5212	48	0,260858		
TOTAL	36,0748	53			

Análisis de Varianza para a - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Gli	0,0105613	1	0,0105613	3,02	0,0887
B:HPMC	0,25476	2	0,12738	36,40	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,238759	2	0,119379	34,12	0,0000
RESIDUOS	0,16796	48	0,00349917		
TOTAL	0,768333	53			

Análisis de Varianza para b - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Gli	0,521667	1	0,521667	3,16	0,0818
B:HPMC	33,8027	2	16,9014	102,41	0,0000
INTERACCIONES					
AB	18,2748	2	9,1374	55,37	0,0000
RESIDUOS	7,92151	48	0,165031		
TOTAL	83,7998	53			

Análisis de Varianza para YI - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Gli	2,46795	1	2,46795	3,47	0,0687
B:HPMC	121,682	2	60,8411	85,47	0,0000
INTERACCIONES					
AB	67,5771	2	33,7885	47,46	0,0000
RESIDUOS	34,1698	48	0,71187		
TOTAL	312,546	53			

B) Tracción

Análisis de Varianza para *deform % nat* - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Glicerol	7839,87	1	7839,87	9,64	0,0050
B:HPMCel	255530,	2	127765,	157,06	0,0000
INTERACCIONES					
AB	17622,7	2	8811,35	10,83	0,0005
RESIDUOS	18709,5	23	813,455		
TOTAL	297557,	28			

Análisis de Varianza para esfuerzo nat - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Glicerol	13,555	1	13,555	99,84	0,0000
B:HPMCel	71,213	2	35,6065	262,26	0,0000
INTERACCIONES					
AB	12,7687	2	6,38433	47,02	0,0000
RESIDUOS	3,12262	23	0,135766		
TOTAL	110,579	28			

Análisis de Varianza para *Mod Young nat* - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Glicerol	2794,29	1	2794,29	145,13	0,0000
B:HPMCel	15732,0	2	7865,98	408,53	0,0000
INTERACCIONES					
AB	1886,45	2	943,227	48,99	0,0000
RESIDUOS	442,848	23	19,2543		
TOTAL	22791,1	28			

C) Espesor

Análisis de Varianza para esp nat - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:glic	0,0000845	1	0,0000845	0,21	0,6540
B:HPMC	0,018148	2	0,009074	22,68	0,0001
INTERACCIONES					
AB	0,010588	2	0,005294	13,23	0,0009
RESIDUOS	0,0048	12	0,0004		
TOTAL	0,0336205	17			

D) Solubilidad

Análisis de Varianza para solub nat - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:glic	80,645	1	80,645	2,03	0,1796
B:HPMC	1653,91	2	826,955	20,83	0,0001
INTERACCIONES					
AB	37,87	2	18,935	0,48	0,6320
RESIDUOS	476,46	12	39,705		
TOTAL	2248,89	17			

E) Humedad

Análisis de Varianza para humedad nat - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:glic	512,0	1	512,0	40,96	0,0000
B:HPMC	1417,0	2	708,5	56,68	0,0000
INTERACCIONES					
AB	217,0	2	108,5	8,68	0,0047
RESIDUOS	150,0	12	12,5		
TOTAL	2296,0	17			

F) PVA

Análisis de Varianza para PVA nat - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:glic	5,40109	1	5,40109	44,26	0,0000
B:HPMC	3,80458	2	1,90229	15,59	0,0005
INTERACCIONES					
AB	2,77658	2	1,38829	11,38	0,0017
RESIDUOS	1,46443	12	0,122036		
TOTAL	13,4467	17			

Películas elaboradas con almidón acetilado

A) Color

Análisis de Varianza para L - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Gli	22,7925	1	22,7925	33,92	0,0000
B:HPMC	52,9089	2	26,4544	39,37	0,0000
INTERACCIONES					
AB	16,2421	2	8,12104	12,08	0,0000
RESIDUOS	44,352	66	0,672001		
TOTAL	136,295	71			

Análisis de Varianza para a - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Gli	0,873401	1	0,873401	47,85	0,0000
B:HPMC	0,0515444	2	0,0257722	1,41	0,2510
INTERACCIONES					
AB	0,0192444	2	0,00962222	0,53	0,5928
RESIDUOS	1,20481	66	0,0182547		
TOTAL	2,149	71			

Análisis de Varianza para b - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Gli	7,96005	1	7,96005	32,96	0,0000
B:HPMC	55,4351	2	27,7175	114,79	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,4044	2	0,2022	0,84	0,4374
RESIDUOS	15,9371	66	0,241472		
TOTAL	79,7367	71			

Análisis de Varianza para YI - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Gli	18,9625	1	18,9625	18,83	0,0001
B:HPMC	233,71	2	116,855	116,06	0,0000
INTERACCIONES					
AB	1,80975	2	0,904876	0,90	0,4120
RESIDUOS	66,4503	66	1,00682		
TOTAL	320,932	71			

B) Tracción

Análisis de Varianza para *def %* - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Gly	134469,	1	134469,	8358,53	0,0000
B:HPMC	172219,	2	86109,3	5352,51	0,0000
INTERACCIONES					
AB	114377,	2	57188,7	3554,82	0,0000
RESIDUOS	466,542	29	16,0876		
TOTAL	355633,	34			

Análisis de Varianza para *esf* - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Gly	350,365	1	350,365	375,89	0,0000
B:HPMC	174,925	2	87,4626	93,83	0,0000
INTERACCIONES					
AB	23,022	2	11,511	12,35	0,0001
RESIDUOS	27,031	29	0,932104		
TOTAL (CORREGIDO)	630,367	34			

Análisis de Varianza para *MY* - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Gly	734383,	1	734383,	839,79	0,0000
B:HPMC	169613,	2	84806,5	96,98	0,0000
INTERACCIONES					
AB	109587,	2	54793,5	62,66	0,0000
RESIDUOS	25360,1	29	874,486		
TOTAL (CORREGIDO)	1,14935E6	34			

C) Espesor

Análisis de Varianza para esp acet - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:glic	0,0018	1	0,0018	2,12	0,1713
B:HPMC	0,037648	2	0,018824	22,15	0,0001
INTERACCIONES					
AB	0,000768	2	0,000384	0,45	0,6469
RESIDUOS	0,0102	12	0,00085		
TOTAL	0,050416	17			

D) Solubilidad

Análisis de Varianza para solub acet - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:glic	180,5	1	180,5	59,41	0,0000
B:HPMC	2252,77	2	1126,39	370,72	0,0000
INTERACCIONES					
AB	295,87	2	147,935	48,69	0,0000
RESIDUOS	36,46	12	3,03833		
TOTAL	2765,6	17			

E) Humedad

Análisis de Varianza para humedad acet - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:glic	1012,5	1	1012,5	96,43	0,0000
B:HPMC	157,0	2	78,5	7,48	0,0078
INTERACCIONES					
AB	171,0	2	85,5	8,14	0,0058
RESIDUOS	126,0	12	10,5		
TOTAL	1466,5	17			

F) PVA

Análisis de Varianza para PVA acet - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:glic	0,081972	1	0,081972	1,84	0,2001
B:HPMC	0,070172	2	0,035086	0,79	0,4774
INTERACCIONES					
AB	0,193944	2	0,096972	2,17	0,1563
RESIDUOS	0,535023	12	0,0445852		
TOTAL	0,881111	17			